

Анализ функционального значения GWAS-значимого для первичной открытоугольной глаукомы полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* (*in silico* исследование)

© Н.В. ЕЛИСЕЕВА, И.В. ПОНОМАРЕНКО, М.И. ЧУРНОСОВ

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

РЕЗЮМЕ

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) — самая распространенная форма глаукомы, в развитии которой значимую роль играют генетические факторы. По данным полногеномных исследований (Genome Wide Association Studies, GWAS), с ПОУГ ассоциирован ген *CDKN2B-AS1*.

Цель исследования. Изучить *in silico* функциональное значение GWAS-значимого для первичной открытоугольной глаукомы полиморфизма гена *CDKN2B-AS1*.

Материал и методы. Для анализа *in silico* на основе данных GWAS-каталога были отобраны пять полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756), ассоциированных с ПОУГ. Изучены регуляторный потенциал, связь с экспрессией и альтернативным сплайсингом генов полиморфизма гена *CDKN2B-AS1*. В работе использовались мировые базы данных по функциональной геномике — HaploReg и GTExportal.

Результаты. Выявлено важное функциональное значение полиморфных локусов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756 гена *CDKN2B-AS1*. Данные локусы находятся в области гистонов, маркирующих энхансеры в регионе гиперчувствительности к ДНКазе I более чем в десяти различных органах и тканях, в области регуляторных мотивов ДНК к пяти факторам транскрипции (AIRE, GATA, Tgif1, Pou2f2 и Zfp187), ассоциированы с экспрессией трех генов (*CDKN2B-AS1*, *CDKN2B*, *CDKN2A*) и альтернативным сплайсингом транскриптов двух генов (*CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4*) в патогенетически значимых для формирования глаукомы культурах клеток, органах, тканях.

Заключение. Полиморфизм гена *CDKN2B-AS1* (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756) имеет важное функциональное значение — связан с экспрессией и альтернативным сплайсингом генов, имеет значимый регуляторный потенциал, что может лежать в основе его ассоциации с ПОУГ.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, *CDKN2B-AS1*, полиморфизм, функциональное значение.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Елисеева Н.В. — e-mail: pbvjdtw@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0707-9714>

Пономаренко И.В. — <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>

Чурносков М.И. — <https://orcid.org/0000-0003-1254-6134>

Автор, ответственный за переписку: Елисеева Н.В. — e-mail: pbvjdtw@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Елисеева Н.В., Пономаренко И.В., Чурносков М.И. Анализ функционального значения GWAS-значимого для первичной открытоугольной глаукомы полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* (*in silico* исследование). *Вестник офтальмологии*. 2021;137(4):43–50. <https://doi.org/10.17116/oftalma202113704143>

Analysis of the functional role of polymorphism in the *CDKN2B-AS1* gene GWAS-significant for primary open-angle glaucoma (an *in-silico* study)

© N.V. ELISEEVA, I.V. PONOMARENKO, M.I. CHURNOSOV

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

ABSTRACT

Primary open-angle glaucoma (POAG) is the most common form of glaucoma in which genetic factors play a significant role. According to genome-wide studies (GWAS), the *CDKN2B-AS1* gene is associated with POAG.

Purpose — to study *in silico* the functional significance of the *CDKN2B-AS1* gene polymorphism GWAS-significant for primary open-angle glaucoma.

Material and methods. The *in-silico* analysis was based on data from the GWAS catalog, five polymorphic loci of the *CDKN2B-AS1* gene (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756) associated with POAG were selected. The study evaluated the regulatory potential, the relationship with the expression and alternative splicing of genes of the *CDKN2B-AS1* gene polymorphism using modern databases for functional genomics — HaploReg and GTExportal.

Results. An important functional significance of the polymorphic loci rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756 of the *CDKN2B-AS1* gene was revealed. These loci are located in the region of histones marking enhancers and in the region of hypersensitivity to DNase-1, can be found in more than ten different organs and tissues, in the regions of regulatory DNA motifs to five transcription factors (AIRE, GATA, Tgif1, Pou2f2, and Zfp187), and are associated with expression of three genes

(*CDKN2B-AS1*, *CDKN2B*, *CDKN2A*) and alternative splicing of transcripts of two genes (*CDKN2B-AS1* and *RP11-149I2.4*) in cell cultures, organs and tissues with pathogenic significance for glaucoma development.

Conclusion. Polymorphism of the *CDKN2B-AS1* gene (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756) has significant regulatory potential and is associated with the expression and alternative splicing of genes, which possibly underlies its association with primary open-angle glaucoma.

Keywords: primary open-angle glaucoma, *CDKN2B-AS1*, polymorphism, functional significance.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Eliseeva N.V. — e-mail: pbyjdtw@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0707-9714>

Ponomarenko I.V. — <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>

Churnosov M.I. — <https://orcid.org/0000-0003-1254-6134>

Corresponding author: Eliseeva N.V. — e-mail: pbyjdtw@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Eliseeva NV, Ponomarenko IV, Churnosov MI. Analysis of the functional role of polymorphism in the *CDKN2B-AS1* gene GWAS-significant for primary open-angle glaucoma (an *in-silico* study). *The Russian Annals of Ophthalmology = Vestnik oftal'mologii*. 2021;137(4):43–50. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma202113704143>

Глаукома — наиболее распространенное глазное заболевание, которое приводит к серьезным необратимым изменениям и значительной потере зрения, вплоть до полной слепоты [1]. В Российской Федерации количество глаукомных больных превышает 1 млн человек [1], а в мире их число составляет свыше 60 млн, и, по прогнозам, распространенность заболевания в ближайшие десятилетия существенно возрастет, так что к 2040 г. численность больных превысит 110 млн человек [2]. Среди всех форм глауком на долю первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) приходится от 72 до 96% [1, 3, 4].

Проведенные к настоящему времени молекулярно-генетические исследования ПОУГ продемонстрировали важную роль в формировании заболевания генетических факторов [5–13]. Результаты многочисленных полногеномных ассоциативных исследований (Genome Wide Association Studies, GWAS) свидетельствуют о связи полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ и различными характеристиками оптического диска (вертикальный размер диска зрительного нерва — ДЗН, площадь экскавации и др.) [10, 14–23].

Выявлено, что рисковое значение для развития ПОУГ имеют аллели А rs4977756 *CDKN2B-AS1* (ОШ=1,48 для населения Европы [23]), А rs7865618 *CDKN2B-AS1* (ОШ=1,56 для японской популяции [16]), тогда как протективная роль в формировании ПОУГ показана для аллелей G rs1063192 *CDKN2B-AS1* (ОШ=0,75 для населения Японии [14]), G rs2157719 *CDKN2B-AS1* (ОШ=0,69–0,71 для популяций различного этнического состава — азиаты, европейцы, афроамериканцы [19, 20]), А rs944800 *CDKN2B-AS1* (ОШ=0,75 в мультиэтнической популяции — европеиды, азиаты, афроамериканцы [10]; **табл. 1**). Следует отметить, что рисковые для ПОУГ генетические варианты полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* (А rs4977756, А rs7865618, А rs1063192, А rs2157719, G rs944800),

по данным проекта «1000 геномов» (представлены в **табл. 2**), в сравнении с «нерисковыми» аллельными вариантами этих локусов встречаются среди населения значительно чаще: в популяциях Европы частоты рисковых для ПОУГ аллелей составляют в целом 0,57–0,68, тогда как в азиатских и афроамериканских популяциях их частоты достигают максимальных значений и составляют уже 0,82–0,90 и 0,67–0,99 соответственно. О высокой распространенности среди населения рисковых для ПОУГ аллелей гена *CDKN2B-AS1* свидетельствуют и данные ранее проведенных полногеномных исследований [10, 22]. Так, в работе К. Burdon и соавт. [22] показано, что аллельный вариант А rs4977756 встречается среди больных открытоугольной глаукомой с частотой 0,76, а в контрольной группе — 0,74 (ОШ=1,14). В исследовании Y. Shiga и соавт. [10], в котором была изучена мультиэтническая популяция, включающая европейцев, азиатов, афроамериканцев, выявлено, что аллель G rs944800, ассоциированный с повышенным риском развития ПОУГ, регистрируется у 88% больных и 85% лиц группы контроля.

В ряде полногеномных исследований также показаны ассоциации полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с различными значимыми в отношении ПОУГ характеристиками оптического диска — вертикальным размером диска зрительного нерва (ДЗН; rs1063192 [15], rs7865618 [17], rs2157719 [21]) и площадью экскавации (rs7865618 [18]; **см. табл. 1**). При этом важно подчеркнуть, что протективные для ПОУГ аллельные варианты гена *CDKN2B-AS1* связаны с меньшими значениями вертикального размера ДЗН и площади экскавации, что соответствует современным представлениям об этиопатогенезе ПОУГ [1, 4]. Так, например, аллели G rs1063192 и G rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* ассоциированы с низким риском ПОУГ (ОШ=0,75 [14] и ОШ=0,69–0,71 [19, 20] соответственно) и меньшим вертикальным размером ДЗН ($\beta = -0,014 \text{ мм}^2$ [15] и $\beta =$

Таблица 1. Данные литературы об ассоциациях полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* (9p21.3), включенных в исследование, с глаукомой и характеристиками оптического диска (результаты полногеномных исследований, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>)

Table 1. Data from research papers on association of polymorph loci of the gene *CDKN2B-AS1* (9p21.3) included in the study with glaucoma and characteristics of the optic nerve head (results of genome-wide studies, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>)

Локус	Фенотип	Показатель ассоциации (уровень значимости) (ассоциированный аллель)	Источник
rs1063192	ПОУГ	ОШ=0,75 ($p=5 \cdot 10^{-11}$) (G)	[14]
	Вертикальный размер ДЗН	$\beta = -0,014 \text{ мм}^2$ ($p=6 \cdot 10^{-11}$) (G)	[15]
rs7865618	ПОУГ	ОШ=1,56 ($p=2 \cdot 10^{-9}$) (A)	[16]
	Вертикальный размер ДЗН	$\beta = -0,013$ ($p=3 \cdot 10^{-20}$) (G)	[17]
	Площадь экскавации	$\beta = -0,023$ ($p=1 \cdot 10^{-21}$) (G)	[18]
rs2157719	ПОУГ	ОШ=0,69 ($p=2 \cdot 10^{-18}$) (G)	[19]
	ПОУГ	ОШ=0,71 ($p=3 \cdot 10^{-33}$) (G)	[20]
	Вертикальный размер ДЗН	$\beta = -0,013$ ($p=4 \cdot 10^{-35}$) (G)	[21]
rs944800	ПОУГ	ОШ=0,75 ($p=4 \cdot 10^{-14}$) (A)	[10]
rs4977756	Открытоугольная глаукома	ОШ=1,50 ($p=4,7 \cdot 10^{-9}$) (A)	[22]
	ПОУГ	ОШ=1,48 ($p=7 \cdot 10^{-30}$) (A)	[23]

Примечание. ОШ — отношение шансов, β — коэффициент линейной регрессии.

Таблица 2. Материалы о функциональном значении (эпигенетические эффекты) GWAS-значимого для ПОУГ ресурса HaploReg (v4.1) (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/>)

Table 2. Information on functional role (epigenetic effects) of GWAS-significant for POAG from the HaploReg (v4.1) database (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/>)

Полиморфизм	Позиция (hg38)	Ref	Alt	Частота альтернативного аллеля (alt) в различных этно-территориальных группах (данные проекта «1000 геномов»)				Enhancer histone marks*	DNase*	Motifs	GRASP QTL	dbSNP func annot
				Африка	Америка	Азия	Европа					
rs1063192	22003368	G	A	0,99	0,79	0,82	0,57		1	AIRE, GATA, Tgif1	3	3'-UTR
rs7865618	22031006	G	A	0,99	0,80	0,90	0,58	2			4	intronic
rs2157719	22033367	C	T	0,99	0,80	0,90	0,58	2	6	Pou2f2, Zfp187	4	intronic
rs944800	22050899	A	G	0,99	0,86	0,90	0,68	12	4	GATA		intronic
rs4977756	22068653	G	A	0,67	0,78	0,79	0,60		1		2	intronic

Примечания. ref — референсный аллель; alt — альтернативный аллель; Enhancer histone marks — расположение полиморфизма в регионе энхансера; DNase — расположение полиморфизма в регионе гиперчувствительности к ДНКазе I; * — приведено количество органов и/или тканей, в которых данный полиморфизм проявляет эпигенетические эффекты; Motifs — расположение полиморфизма в регионе регуляторного мотива ДНК; GRASP QTL — данные о связи полиморфизма с экспрессией генов (указано количество значимых ассоциаций); dbSNP func annot — расположение полиморфизма в функциональном участке гена *CDKN2B-AS1*.

−0,013 [21] соответственно). Аналогично аллель G rs7865618 *CDKN2B-AS1* имеет протективное значение для ПОУГ (для альтернативного ему аллеля A ОШ=1,56 [16]) и связан с меньшими значениями вертикального размера ДЗН ($\beta = -0,013$ [17]) и площади экскавации ($\beta = -0,023$ [18]).

Следует отметить, что полиморфные локусы гена *CDKN2B-AS1*, ассоциированные с ПОУГ, находятся в интронных участках этого гена (т.е. не приводят к изменению аминокислотной последовательности в кодируемом полипептиде и не влияют на его активность), и поэтому до настоящего времени в значительной степени остаются неизвестными биологические механизмы, лежащие в основе ассоциаций полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* с ПОУГ.

Цель работы — изучение *in silico* функционального значения GWAS-значимого для ПОУГ полиморфизма гена *CDKN2B-AS1*.

Материал и методы

В соответствии с целью настоящей работы для исследования были отобраны пять полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800, rs4977756), ассоциированных с ПОУГ, а также с различными характеристиками оптического диска (вертикальный размер ДЗН, площадь экскавации) по данным полногеномных исследований (см. табл. 1) [10, 14–21, 23]. Для поиска полиморфных локусов использовался каталог полногеномных исследований National Human Genome Research Institute (<http://www.genome.gov/gwastudies/>). Среди включенных в настоящее исследование пяти полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* уровень патогенности в базе данных Clinvar National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) представлен лишь для одного

полиморфизма — rs1063192 (протективный фактор для заболеваний сосудов сердца), а по остальным четырем локусам информация в базе данных Clinvar отсутствует.

На следующем этапе работы *in silico* был проведен анализ функционального значения этих полиморфных локусов — изучались их эпигенетические эффекты, ассоциации с экспрессией генов (eQTL) и альтернативным сплайсингом транскриптов генов (sQTL) [24]. В работе использовались следующие современные мировые базы данных по функциональной геномике: 1) изучение эпигенетических эффектов — программа HaploReg (v4.1) (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/>) [25] (рассматривалась модель Core 25-state model using 12 imputed marks); 2) связь SNPs с экспрессией генов в различных органах и тканях — база данных GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) [26]; 3) ассоциации SNPs с уровнем альтернативного сплайсинга генов — база данных GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) [26]. В онлайн-базе данных GTExportal приведены результаты международного проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx) [26], демонстрирующие показатели экспрессии и альтернативного сплайсинга генов в 15 201 образце из 49 различных органов и тканей 838 индивидуумов (dbGaP Accession phs000424.v8.p2). При изучении связи аллельных вариантов исследуемых полиморфных локусов с изменением аффинности мотивов ДНК к транскрипционным факторам, их ассоциации с уровнем транскрипции генов и альтернативным сплайсингом транскриптов генов использовались методики, представленные в ранее опубликованных работах [27—31]. Для оценки ассоциации рассматриваемых референсных и альтернативных аллелей изучаемых полиморфизмов гена *CDKN2B-AS1* с уровнем экспрессии и альтернативного сплайсинга различных генов применялся коэффициент линейной регрессии (β), который описывает изменение в сторону уменьшения (отрицательное значение показателя) или увеличения (положительное значение показателя) нормализованного значения величины экспрессии гена или сплайсинга интронного участка гена на один минорный (альтернативный) генетический вариант (в работу включались статистически значимые eQTL и sQTL при $p < 8 \cdot 10^{-5}$ и $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Регуляторные эффекты (regSNP). При изучении эпигенетических эффектов пяти полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* выявлено (см. табл. 2), что три полиморфизма (rs7865618, rs2157719, rs944800) находятся в регионе модифицированных гистоновых белков, маркирующих энхансеры в различных культурах клеток, органах и тканях (культуры клеток мезодермы, эктодермы и энтодермы, мезен-

химные стволовые клетки, фибробласты, ядра адицитов и др.). Четыре SNPs: rs1063192, rs2157719, rs944800, rs4977756 — локализируются в регионе гиперчувствительности к ДНКазе I более чем в 10 различных культурах клеток, органах и тканях (разные отделы головного мозга взрослого, головной мозг плода, первичная культура нейросфер, культура клеток — предшественников нейронов и др.). Три полиморфизма (rs1063192, rs2157719, rs944800) расположены в регионе пяти регуляторных мотивов ДНК к факторам транскрипции (AIRE, GATA, Tgif1, Pou2f2 и Zfp187).

По данным HaploReg (v4.1), аллель G rs1063192 гена *CDKN2B-AS1* повышает аффинность к факторам транскрипции AIRE [различие между LOD scores аллелей G (alt) и A (ref) составляет 12,0], GATA [различие между LOD scores аллелей G (alt) и A (ref) составляет 12,0] и снижает аффинность к транскрипционному фактору Tgif1 [различие между LOD scores аллелей G (alt) и A (ref) составляет -11,8]. Аллель G rs2157719 снижает сродство регуляторного мотива ДНК к факторам транскрипции Pou2f2 [различие между LOD scores аллелей G (alt) и A (ref) составляет -2,0] и Zfp187 [различие между LOD scores аллелей G (alt) и A (ref) составляет -5,4], а аллель A rs944800 повышает аффинность к транскрипционному фактору GATA [различие между LOD scores аллелей A (alt) и G (ref) составляет 12,0].

Влияние на транскрипцию генов (eQTL-данные). На основе данных проекта Genotype-Tissue Expression установлены значимые ($p < 8 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$) ассоциации четырех из пяти рассматриваемых нами полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* (rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800) с уровнем транскрипции трех генов (*CDKN2B-AS1*, *CDKN2B*, *CDKN2A*). Лишь полиморфизм rs4977756 не имеет самостоятельного eQTL-значения.

Выявлено, что аллель A rs944800 ассоциирован с низкой экспрессией гена *CDKN2B-AS1* в культуре клеток фибробластов (для аллеля G этого полиморфного локуса $\beta = 0,26$, $p = 2,60 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$), а аллели G rs1063192, rs7865618 и rs2157719 гена *CDKN2B-AS1* связаны с пониженной экспрессией гена *CDKN2A* в коре головного мозга (для аллелей A этих полиморфных локусов $\beta = 0,33$, $p = 3,10 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$, $\beta = 0,33$, $p = 4,50 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$ и $\beta = 0,33$, $p = 4,50 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$ соответственно) и повышенной транскрипцией гена *CDKN2B* в скелетной мускулатуре (для аллелей A этих полиморфных локусов $\beta = -0,14$, $p = 5,10 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$, $\beta = -0,14$, $p = 8,50 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$ и $\beta = -0,14$, $p = 9,0 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$ соответственно).

Ассоциации с альтернативным сплайсингом транскриптов генов (sQTL-данные). Выявлены ассоциации изучаемых нами полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта двух генов (*CDKN2B-AS1* и *RP11-14912.4*)

в гипофизе ($p < 8 \cdot 10^{-5}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$) (для всех пяти полиморфизмов ID интрона 21995161:22046751:clu_55270). Следует отметить, что с низким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе ассоциированы аллели G rs1063192 (для аллеля A $\beta=0,47$, $p=7,90 \cdot 10^{-9}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$), rs7865618 (для аллеля A $\beta=0,47$, $p=1,20 \cdot 10^{-8}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$), rs2157719 (для аллеля A $\beta=0,47$, $p=1,30 \cdot 10^{-8}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$), rs4977756 (для аллеля A $\beta=0,43$, $p=9,30 \cdot 10^{-8}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$) и аллель A rs944800 (для аллеля G $\beta=0,40$, $p=4,00 \cdot 10^{-6}$, $p_{\text{FDR}} \leq 0,05$).

Таким образом, согласно полученным нами данным, полиморфные локусы rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800 и rs4977756 гена *CDKN2B-AS1* имеют значимый регуляторный потенциал и важное eQTL- и sQTL-значение. Следует отметить, что пять изученных нами полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1*, несмотря на то что находятся на значительном расстоянии друг от друга (63,5 kb), достаточно сильно сцеплены между собой ($r^2 \geq 0,57$, $D' \geq 0,90$) и вследствие этого их функциональные эффекты могут «перекрываться». Данные полиморфные локусы расположены в области гистонов, маркирующих энхансеры и регионе гиперчувствительности к ДНКазе I более чем в 10 различных органах и тканях, области регуляторных мотивов ДНК к пяти факторам транскрипции (AIRE, GATA, Tgif1, Pou2f2 и Zfp187), ассоциированы с экспрессией трех генов (*CDKN2B-AS1*, *CDKN2B*, *CDKN2A*) и альтернативным сплайсингом транскриптов двух генов (*CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4*). Важно отметить, что свои функциональные эффекты (эпигенетические, eQTL, sQTL) эти локусы проявляют в патогенетически значимых для формирования ПОУГ культурах клеток, органах и тканях: фибробластах, центральной нервной системе (кора головного мозга, гипофиз) и др.

В настоящем исследовании *in silico* установлено, что аллель G rs1063192 гена *CDKN2B-AS1* (согласно данным литературы, имеющий протективное значение для развития ПОУГ среди населения Японии [14]) повышает аффинность к факторам транскрипции AIRE и GATA, снижает сродство к транскрипционному фактору Tgif1, связан с более низкой экспрессией гена *CDKN2A* в коре головного мозга и повышенной транскрипцией гена *CDKN2B* в скелетной мускулатуре, определяет пониженный уровень альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе. Аналогичное влияние на экспрессию генов *CDKN2A* и *CDKN2B* в коре головного мозга и скелетной мускулатуре, а также на уровень альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе, согласно полученным нами данным, оказывает и аллель G rs7865618 гена *CDKN2B-AS1* (по данным литературы, он является протективным фактором развития ПОУГ в японской популяции [16]). Нами выявлено, что аллель G rs2157719 (согласно ра-

нее проведенным полногеномным исследованиям, ассоциированный с низким риском развития ПОУГ в популяциях различного этнического состава — азиаты, европейцы, афроамериканцы [19, 20]) снижает сродство регуляторного мотива ДНК к факторам транскрипции Pou2f2 и Zfp187, связан с низкой транскрипцией гена *CDKN2A* в коре головного мозга и высокой экспрессией гена *CDKN2B* в скелетной мускулатуре, определяет пониженный уровень альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе. Также в результате настоящего исследования установлено, что аллель G rs4977756 (данные литературы свидетельствуют о протективном значении этого генетического варианта для развития ПОУГ среди европеоидного населения [23]) связан с низким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе. Полученные нами результаты указывают на то, что аллель A rs944800 (согласно материалам ранее проведенных полногеномных исследований, служащий протективным фактором развития ПОУГ в популяциях различного этнического состава — азиаты, европейцы, афроамериканцы [10]) повышает аффинность к транскрипционному фактору GATA, ассоциирован с низкой экспрессией гена *CDKN2B-AS1* в культуре клеток фибробластов и низким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе.

Итак, протективные для ПОУГ, согласно результатам проведенных ранее полногеномных исследований [10, 14, 16, 19, 20, 23], полиморфные варианты гена *CDKN2B-AS1* — аллели G rs4977756, G rs7865618, G rs1063192, G rs2157719, A rs944800, в соответствии с полученными нами *in silico* данными, повышают аффинность к факторам транскрипции AIRE и GATA, снижают сродство к транскрипционным факторам Tgif1, Pou2f2 и Zfp187, ассоциированы с низкой экспрессией гена *CDKN2B-AS1* в культуре клеток фибробластов и гена *CDKN2A* в коре головного мозга, повышенной транскрипцией гена *CDKN2B* в скелетной мускулатуре, связаны с низким уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе. Эти функциональные эффекты полиморфных локусов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800 и rs4977756 гена *CDKN2B-AS1* могут являться медико-биологической основой их ассоциаций с ПОУГ.

В данной работе нами *in silico* выявлена связь полиморфизма гена *CDKN2B-AS1* с уровнем экспрессии этого гена в культуре клеток фибробластов. Следует отметить, что фибробласты, являясь одним из основных структурных элементов соединительной ткани организма, играют ключевую роль в образовании белков коллагена и эластина, а также других компонентов внеклеточного матрикса (протеогликаны и др.), которые, согласно данным литературы, имеют

важное значение в этиопатогенезе глаукомы [32]. Соединительная ткань играет существенную роль в возникновении заболевания в рамках механической теории патогенеза ПОУГ, при этом наблюдается дисбаланс в образовании компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллагена, протеогликанов, молекул клеточной адгезии), что в результате обуславливает повышение жесткости и снижение эластических свойств роговицы и склеры глаза [4, 32]. Снижение ригидности фиброзных оболочек глаза и внутриглазных структур (трабекулярной и решетчатой диафрагм) — один из важных локальных факторов риска возникновения ПОУГ [1]. Считается, что нарастающая дезорганизация, деструкция соединительной ткани как переднего, так и заднего отдела глаза является начальным звеном патогенеза первичной глаукомы [4].

В результате проведенного *in silico* анализа мы показали связь GWAS-значимых для ПОУГ полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* с экспрессией гена *CDKN2A* в коре головного мозга и уровнем альтернативного сплайсинга транскрипта генов *CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4* в гипофизе, что согласуется с современными представлениями о ключевой роли различных отделов центральной нервной системы (кора головного мозга, гипофиз) в регуляции всех процессов, происходящих в организме, в том числе имеющих важное значение для патофизиологии глаукомы (метаболических, сосудистых и др.) [4]. Такие хронические системные заболевания, как гипертензия, сахарный диабет и ожирение, вовлеченность в развитие которых коры головного мозга и гипофиза в настоящее время не вызывает сомнений, могут коррелировать с ключевыми патогенетическими процессами ПОУГ — повышением внутриглазного давления и нарушением сосудистого снабжения головки зрительного нерва [33]. Вазоспазм, артериальная гипертензия и гипотензия, ночное снижение артериального давления являются важными факторами риска развития ПОУГ в рамках сосудистой концепции патогенеза заболевания [4]. Метаболические нарушения в организме, согласно данным литературы, повышают риск развития глаукомы и играют ключевую роль в патофизиологии заболевания [1, 4]. Современные данные свидетельствуют об общих «генетических основах» ряда хронических системных заболеваний и ПОУГ. Так, в полногеномном исследовании Y. Shiga и соавт. [10] установлены значимые генетические корреляции между ПОУГ и такими заболеваниями, как сахарный диабет 2-го типа ($r^2=0,27$; $p=0,0002$), инфаркт миокарда ($r^2=0,20$; $p=0,02$), ишемический инсульт ($r^2=0,27$; $p=0,04$).

Материалы базы данных GeneCards: The Human Gene Database свидетельствуют о том, что ген *CDKN2B-AS1* (относится к группе генов, кодирующих lncRNA) расположен в кластере генов *CDKN2B*

и *CDKN2A* на хромосоме 9p21 и кодируемая им lncRNA, взаимодействуя с поликомбинированными репрессивными комплексами 1 (PRC1) и 2 (PRC2), приводит к значительным эпигенетическим изменениям: PRC2 метилирует гистон H3 на лизине 27, т.е. приводит к появлению модифицированных гистоновых белков H3K27me3 — маркер «молчащей» ДНК, а PRC1, взаимодействуя с H3K27me3 и моноубиквитинируя гистоны H2A на лизине 119 (H2AK119Ub1), ингибирует активированную форму комплекса преинициирования РНК-полимеразы II, что обеспечивает сохранение длительного эпигенетического «молчания» хроматина. Конечный результат этих процессов — подавление экспрессии генов, так как происходят значительные изменения структуры хроматина, при которых транскрипционные факторы не могут связываться с промоторными последовательностями ДНК. Следует отметить, что с интронного участка гена *CDKN2B-AS1*, согласно базе данных GTExportal, транскрибируется еще один ген — *RP11-149I2.4*, для которого sQTL-значение имеют исследуемые нами полиморфные локусы. *RP11-149I2.4* относится к генам, контролирующим образование длинных некодирующих РНК (lncRNAs) (<http://www.ensembl.org/>), информация о нем в базах данных GeneCards: The Human Gene Database и Ensembl не представлена.

По данным GeneCards: The Human Gene Database (<https://www.genecards.org/>), ген *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) кодирует несколько (не менее трех) вариантов транскрипта, которые различаются своими первыми экзонами. Два из них кодируют структурно родственные изоформы, известные как ингибиторы циклин-зависимой киназы CDK4. Третий транскрипт содержит альтернативную открытую рамку считывания и кодирует белок, который является стабилизатором белка — супрессора опухоли p53 (за счет взаимодействия с E3 убиквитин-белковой лигазой MDM2 и белком, ответственным за деградацию p53). Несмотря на структурные и функциональные различия, белки, кодируемые геном *CDKN2A*, имеют сходное функциональное значение: за счет регуляторной роли CDK4 и p53 контролируют G1-фазу клеточного цикла и тем самым служат важными регуляторами роста клеток.

Ген *CDKN2B* кодирует ингибитор 2В циклин-зависимых киназ (CDK), который, образуя комплекс с CDK4 или CDK6, предотвращает активацию этих киназ. Кодируемый геном *CDKN2B* белок, контролируя G1-фазу клеточного цикла, является важным регулятором роста клеток. В индукцию экспрессии этого гена вовлечен трансформирующий фактор роста β (TGF- β), и именно с CDKN2B связывают индуцированное TGF- β ингибирование роста. Имеются данные о двух вариантах альтернативного сплайсинга

транскрипта этого гена, которые кодируют различные белки (<https://www.genecards.org/>).

Заклучение

В результате проведенного *in silico* исследования выявлено важное функциональное значение GWAS-значимых для ПОУГ полиморфных локусов rs1063192, rs7865618, rs2157719, rs944800 и rs4977756 гена *CDKN2B-AS1*. Эти полиморфные локусы расположены в области гистонов, маркирующих энхансеры, в регионе гиперчувствительности к ДНКазе I более чем в 10 различных органах и тканях, области регуляторных мотивов ДНК к пяти факторам транскрипции (AIRE, GATA, Tgif1, Pou2f2 и Zfp187), ассоциированы с экспрессией трех генов (*CDKN2B-AS1*, *CDKN2B*, *CDKN2A*) и альтерна-

тивным сплайсингом транскриптов двух генов (*CDKN2B-AS1* и *RP11-149I2.4*) в патогенетически значимых для формирования ПОУГ культурах клеток, органах и тканях. Установленные нами медико-биологические эффекты полиморфных локусов гена *CDKN2B-AS1* могут лежать в основе их ассоциации с глаукомой, что расширяет представления об отдельных механизмах патофизиологии заболевания.

Участие авторов:

Концепция и дизайн: Н.Е., М.Ч., И.П.
Сбор и обработка материала: Н.Е., М.Ч., И.П.
Написание текста: Н.Е., М.Ч.
Редактирование: М.Ч., Н.Е.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Егоров Е.А. *Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей*. Под ред. Егорова Е.А., Астахова Ю.С., Еричева В.П. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
2. Egorov EA. *Nacional'noe rukovodstvo po glaukome: dlya praktikuyushchih vrachej* [National Guidelines for Glaucoma: For Medical Practitioners]. Egorov E.A., Astahov Yu.S., Eriчев V.P., eds. M.: GEOTAR-Media; 2015. (In Russ.).
3. Starikova D, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Dvornik V, Churnosov M. Novel data about association of the functionally significant polymorphisms of the MMP-9 gene with exfoliation glaucoma in the Caucasian population of Central Russia. *Ophthalmic Res.* [published online ahead of print, 2020 Oct 23]. <https://doi.org/10.1159/000512507>
4. Кириленко М.Ю., Тикунова Е.В., Сиротина С.С., Полоников А.В., Бушуева О.Ю., Чурносоев М.И. Изучение ассоциаций генетических полиморфизмов факторов роста с развитием первичной открытоугольной глаукомы. *Вестник офтальмологии*. 2017;133(3):9-15. Kirilenko MYu, Tikunova EB, Sirochina SS, Polonikov AV, Bushueva OYu, Churnosov MI. Study of the associations of genetic polymorphisms of growth factors with the development of primary open-angle glaucoma. *Vestnik oftalmologii*. 2017;133(3):9-15. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma201713339-15>
5. Tikunova E, Ovtcharova V, Reshetnikov E, et al. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of central Russia. *Int J Ophthalmol*. 2017;10(10):1490-1494.
6. Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, et al. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2018;27(8):1486-149. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy053>
7. Eliseeva N, Ponomarenko I, Reshetnikov E, Dvornik V, Churnosov M. The LOXL1 gene polymorphisms candidate for exfoliation glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population of Central Russia. *Mol Vis*. 2021; в печати.
8. Свинаярева Д.И. Вклад ген-генных взаимодействий полиморфных локусов матриксных металлопротеиназ в подверженность к первичной открытоугольной глаукоме у мужчин. *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2020;6(1):63-77. Svinareva DI. The contribution of gene-gene interactions of polymorphic loci of matrix metalloproteinases to susceptibility to primary open-angle glaucoma in men. *Nauchnyye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*. 2020;6(1):63-77. (In Russ.). <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-1-0-6>
9. Елисеєва Н.В., Чурносоев М.И. Полногеномные исследования первичной открытоугольной глаукомы. *Вестник офтальмологии*. 2020;136(5):129-135. Eliseeva NV, Churnosov MI. Genome-wide studies of primary open-angle glaucoma. *Vestnik oftalmologii*. 2020;136(5):129-135. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2020136051129>
9. Osman W, Low SK, Takahashi A, Kubo M, Nakamura Y. A genome-wide association study in the Japanese population confirms 9p21 and 14q23 as susceptibility loci for primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2012;21(12):2836-2842. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds103>
10. Ramdas WD, van Koolwijk LM, Ikram MK, et al. A genome-wide association study of optic disc parameters. *PLoS Genet*. 2010;6(6):e1000978. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000978>
11. Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, et al. Common variants in CDKN2B-AS1 associated with optic-nerve vulnerability of glaucoma identified by genome-wide association studies in Japanese. *PLoS One*. 2012;7(3):e33389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033389>
12. Springelkamp H, Höhn R, Mishra A, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci that influence cupping and the glaucomatous process. *Nat Commun*. 2014;5:4883.
13. Springelkamp H, Mishra A, Hysi PG, et al. Meta-analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Novel Loci Associated With Optic Disc Morphology. *Genet Epidemiol*. 2015;39(3):207-216. <https://doi.org/10.1002/gepi.21886>
14. Wiggs JL, Yaspan DL, Hauser MA, et al. Common variants at 9p21 and 8q22 are associated with increased susceptibility to optic nerve degeneration in glaucoma. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002654. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002654>
15. Li Z, Allingham RR, Nakano M, et al. A common variant near TGFB3 is associated with primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2015;24(13):3880-3892. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv128>
16. Springelkamp H, Iglesias AI, Mishra A, et al. New insights into the genetics of primary open-angle glaucoma based on meta-analyses of intraocular pressure and optic disc characteristics. *Hum Mol Genet*. 2017;26:438-453.
17. Burdon KP, Macgregor S, Hewitt AW, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat Genet*. 2011;43:574-578.
18. Charahkhani P, Burdon RK, Fogarty R, et al. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma. *Nat Genet*. 2014;46(10):1120-112. <https://doi.org/10.1038/ng.3079>
19. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Altuchova O, et al. Association of genetic polymorphisms with age at menarche in Russian women. *Gene*. 2019;(686):228-236.
20. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):877-881.
21. GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):1318-1330. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>

22. Пономаренко И.В., Полоников А.В., Чурносков М.И. Полиморфные локусы гена LHCGR, ассоциированные с развитием миомы матки. *Акушерство и гинекология*. 2018;(10):86-91. Ponomarenko IV, Polonikov AV, Churnosov MI. Polymorphic LHCGR gene loci associated with the development of uterine fibroids. *Akusherstvo i Ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2018;(10):86-91. (In Russ.). <https://doi.org/doi.orgaig.2018.10.86-91>
23. Пономаренко И.В., Решетников Е.А., Полоников А.В., Чурносков М.И. Полиморфный локус rs314276 гена LIN28B ассоциирован с возрастом менархе у женщин Центрального Черноземья России. *Акушерство и гинекология*. 2019;(2):98-104. Ponomarenko IV, Reshetnikov EA, Polonikov AV, Churnosov MI. The polymorphic locus rs314276 of the LIN28B gene is associated with the age of menarche in women of the Central Black Earth Region of Russia. *Akusherstvo i Ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*. 2019;(2):98-104. (In Russ.).
24. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia. *Gene*. 2020;757:144933. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
25. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2020;41(5):943-956. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
26. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with uterine leiomyoma. *Front Genet*. 2021;11:512940. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.512940>
27. Свинаярева Д.И., Чурносков М.И. Роль матриксных металлопротеиназ в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Вестник офтальмологии*. 2020;136(4):146-150. Svinareva DI, Churnosov MI. The role of metalloproteinases in the development of primary open-angle glaucoma. *Vestnik oftal'mologii*. 2020;136(4):146-150. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2020136041146>
28. Tham YC, Cheng CY. Associations between chronic systemic diseases and primary open angle glaucoma: an epidemiological perspective. *Clin Exp Ophthalmol*. 2017;45:24-32.

Поступила 24.02.2021

Received 24.02.2021

Принята к печати 13.04.2021

Accepted 13.04.2021