

Streszczenie

Związek zmienności genów naprawy DNA przez wycinanie zasad z występowaniem stożka rogówki i dystrofii śródbłonka rogówki Fuchsa

Stożek rogówki (KC, ang. *keratoconus*) jest chorobą, którą cechują zmiany w strukturze rogówki prowadzące do rozwoju astygmatyzmu, krótkowzroczności i znacznego upośledzenia jakości widzenia.

Dystrofia śródbłonka rogówki Fuchsa (FECD, ang. *Fuchs endothelial corneal dystrophy*) jest powoli postępującą chorobą oczu, występującą w tylnej części rogówki. Choroba prowadzi do zmętnienia rogówki i utraty ostrości widzenia.

KC i FECD należą do schorzeń o złożonej etiologii. Wysokie obciążenie rodzinne tych chorób, badania nad występowaniem KC i FECD wśród bliźniąt oraz analizy genetyczne i genomowe, wskazują na udział czynników genetycznych w rozwoju tych zaburzeń. Szereg badań sugeruje także, że stres oksydacyjny jest istotnym elementem patogenezы obydwu chorób. Stała ekspozycja na promieniowanie słoneczne, w tym UV, skutkuje indukcją reaktywnych form tlenu (ROS). W komórce funkcjonują mechanizmy ochronne, które bronią ją przed powstaniem uszkodzeń oksydacyjnych oraz naprawiają powstałe już uszkodzenia. W rogówkach osób z KC i FECD stwierdzono defekty ochrony antyoksydacyjnej. Wykryto także, że rogówki osób z KC i FECD charakteryzuje wyższy poziom uszkodzeń DNA. Stres oksydacyjny i związane z nim uszkodzenia DNA mogą wynikać także z różnorodności wariantów genów naprawy DNA. Niektóre warianty mogą prowadzić do spadku efektywności procesu naprawy DNA, czego skutkiem jest wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Obniżona zdolność naprawy DNA jest uznawana za czynnik silnie predysponujący do rozwoju wielu schorzeń. W naprawie uszkodzeń DNA wywołanych stresem oksydacyjnym ważną rolę odgrywa system naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych (BER, *base excision repair*), który bierze udział w usuwaniu różnych uszkodzeń oksydacyjnych, w tym modyfikacji zasad DNA. Naprawa uszkodzeń DNA przez BER jest prowadzona i koordynowana przez wiele białek, w tym przez glikozylazę DNA NEIL1, endonukleazę AP 1 (APEX1), endonukleazę Flap 1 (FEN1), polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 (PARP1), polimerazę gamma (Poly) oraz XRCC1, których geny były badane w niniejszej pracy.

Celem pracy było określenie roli zmienności genów naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych w patogenezie stożka rogówki i dystrofii śródbłonka rogówki Fuchsa.

Materiał do badań stanowiły próbki krwi obwodowej pobrane od pacjentów z KC, FECD i osób z grupy kontrolnej, u których wykluczono obecność tych chorób. Genomowy DNA będący materiałem do analizy polimorfizmów wyizolowano z krwi obwodowej przy użyciu zestawu AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA).

Analizie poddano 9 polimorfizmów:

- 2 polimorfizmy genu *FEN1*: c.-441G>A (rs174538), g.61564299G>T (rs4246215),
- 2 polimorfizmy genu *APEX1*: c.444T>G (rs1130409), c.-468T>G (rs1760944),
- polimorfizm g.46438521G>C (rs4462560) genu *NEIL1*,
- polimorfizm c.2285T>C (rs1136410) genu *PARP-1*,
- polimorfizm c.-1370T>A (rs1054875) genu *POLG*,
- 2 polimorfizmy genu *XRCC1*: c.580C>T (rs1799782), c.1196A>G (rs25487).

Do genotypowania polimorfizmów zastosowano technikę PCR-RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), analizę krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRM, *High Resolution Melt*) i metodą RT-PCR z użyciem sondy TaqMan.

Rezultaty otrzymane w toku badań wskazują na wyższą częstość występowania KC wśród osób płci męskiej, u osób z wadami wzroku, alergiami oraz wśród pacjentów z obciążeniem rodzinnym tą chorobą. Dodatkowo średnia wieku osób z KC była niższa (wynosiła ok. 36 lat) w stosunku do grupy kontrolnej (ok. 63 lat), dlatego też wiek został uwzględniony w dalszej części badań jako czynnik ryzyka tej chorób. Przeprowadzona analiza OR wykazała, że genotyp T/T polimorfizmu g.61564299G>T genu *FEN1* związany jest ze zwiększoną częstością występowania KC. Stwierdzono, że genotyp T/T polimorfizmu c.-468T>G genu *APEX1* jest pozytywnie skorelowany z występowaniem KC, podczas gdy genotyp G/T tego polimorfizmu związany jest ze zmniejszoną częstością występowania tej choroby. Genotyp A/A polimorfizmu c.-1370T>A genu *POLG* związany jest ze zwiększoną, a genotyp A/T ze zmniejszoną częstością występowania KC. Genotyp A/G oraz allel A polimorfizmu c.1196A>G genu *XRCC1* związane są ze zwiększoną częstością występowania KC, podczas gdy genotyp G/G i allel G wykazują odwrotną korelację. Genotyp C/T oraz allel T polimorfizmu c.580C>T genu *XRCC1* związane są ze zwiększoną częstością występowania KC, podczas gdy genotyp C/C

wykazuje odwrotny związek. Nie stwierdzono korelacji między rozkładem genotypów/alleli polimorfizmów: c.-441G>A genu *FEN1*, c.444T>G genu *APEX1*, g.46438521G>C genu *NEIL1* i c.2285T>C genu *PARP-1*, a zmianą częstości występowania KC. Obserwowano związek pomiędzy haplotypami polimorfizmów g.61564299G>T i c.-441G>A genu *FEN1* oraz c.1196A>G i c.580C>T genu *XRCC1*, a zmianą częstości występowania KC.

Zaobserwowano, że płeć żeńska, starszy wiek, obciążenie FECD w rodzinie i współwystępowanie zaburzeń widzenia są pozytywnie skorelowane z występowaniem FECD. Otrzymane wyniki wskazują, że genotyp T/T polimorfizmu g.61564299G>T genu *FEN1* związany jest ze zwiększoną częstością występowania FECD. Nie stwierdzono istotnie statystycznie różnic w częstości genotypów/alleli polimorfizmów: c.-441 G>A genu *FEN1* c.444T>G i c.-468T>G *APEX1* a występowaniem FECD. Zaobserwowano związek pomiędzy rozkładem haplotypów polimorfizmów g.61564299G>T i c.-441G>A genu *FEN1* a występowaniem FECD.

Podsumowując, wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej, stanowią podstawę do stwierdzenia, iż zmienność w genach naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych może mieć istotne znaczenie dla występowania KC i FECD.

Summary

Variation in DNA base excision repair genes in keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy

Keratoconus (KC) is a disease that is characterized by changes in the structure of the cornea leading to the development of corneal astigmatism, myopia and significant deterioration of vision.

Fuchs endothelial corneal dystrophy (FECD) is a slowly progressive eye disease that affects posterior layers of the cornea. In the advanced stages of this disease, endothelial cell thinning induces corneal edema and loss of vision.

KC and FECD are diseases with complex etiologies. High familial aggregation of these diseases, twin studies, as well as results of many genetic and genomic analyses, indicate the involvement of genetic factors in their development. Moreover, a number of studies suggest that oxidative stress is associated with the pathogenesis of both diseases. Constant exposure to sunlight, including ultraviolet (UV) radiation, induces reactive oxygen species (ROS). Antioxidant defense mechanisms operating in the cells neutralize ROS and repair damage resulted from their action. A growing body of evidence shows disturbances in antioxidant defense system in corneas with FECD and KC. It was also detected that KC and FECD corneas had a higher level of DNA damage. Oxidative stress and oxidative DNA damage may result from the variability of DNA repair genes. The variation in these genes may lead to a decrease in the efficiency of the DNA repair, resulting in an increase in the level of oxidative DNA damage. A reduced ability to repair DNA damage is associated with the development of several diseases. Base excision repair (BER) system plays an important role in the repair of DNA damage induced by oxidative stress. BER is involved in the removal of various oxidative damages, including DNA base modifications. Repair of DNA damage by the BER is processed and coordinated by several proteins, including DNA glycosylase – endonuclease VIII-like 1 (NEIL1), APEX nuclease 1 (APEX1), Flap endonuclease 1 (FEN1), poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), DNA polymerase gamma (Poly) and X -ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1).

The purpose of these investigations was to elucidate the role of variation in base excision repair genes in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy.

The study was performed on blood samples obtained from KC, FECD patients and individuals with FECD/KC exclusion – control subjects. Genomic DNA was extracted from venous blood using the commercially available AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA).

This research involved nine polymorphisms:

- c.–441G>A (rs174538) and g.61564299G>T (rs4246215) in the *FEN1* gene,
- c.444T>G (rs1130409) and c.–468T>G (rs1760944) in the *APEX1*,
- g.46438521G>C (rs4462560) in the *NEIL1* gene,
- c.2285T>C (rs1136410) in the *PARP-1* gene,
- c.–1370T>A (rs1054875) in *POLG* gene,
- c.580C>T (rs1799782) and c.1196A>G (rs25487) in the *XRCC1* gene.

Genotyping of polymorphisms was performed by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method, high-resolution melting curve analysis (HRM) and the TaqMan® SNP Genotyping Assay.

Results of the experiments indicated that male sex, co-occurrence of visual disturbances, allergies and positive family history for KC significantly increased the occurrence of KC. In addition, the average age of the KC patients was significantly lower (about 36 years) compared to the control group (around 63 years), therefore the age was assumed as a risk factor for the disease in the further part of the study. The analysis showed that the T/T genotype of g.61564299G>T polymorphism of the *FEN1* gene was associated with an increased KC occurrence. It was found that the T/T genotype of c.–468T>G polymorphism of the *APEX1* gene was positively correlated with KC occurrence, while the G/T genotype of this polymorphism was associated with a decreased occurrence of the disease. The A/A genotype of c.–1370T>A polymorphism of the *POLG* gene was associated with an increased, whereas the A/T genotype with a decreased KC occurrence. The A/G genotype and A allele of the c.1196A>G polymorphism of *XRCC1* were associated with an increased KC occurrence, while the G/G genotype and G allele exhibited opposite tendency. The C/T genotype and T allele of the c.580C>T polymorphism of the *XRCC1* gene were associated with an increased KC occurrence, while the C/C genotype showed opposite relationship. There was no association between the distribution of genotypes/alleles of c.–441G>A – *FEN1*, c.444T>G – *APEX1*, g.46438521G>C – *NEIL1* and c.2285T>C – *PARP-1*, polymorphisms and KC occurrence. Associations between haplotypes of the g.61564299G>T and c.–441G>A polymorphisms

of the *FEN1* gene and c.1196A>G and c.580C>T polymorphisms of the *XRCC1* and KC occurrence were observed.

It was found that female sex, older age, positive family history for FECD and co-occurrence of visual disturbances were positively correlated with FECD occurrence. The results showed that the T/T genotype of the g.61564299G>T polymorphism of the *FEN1* gene was associated with an increased FECD occurrence. There were no statistically significant differences in the frequency of genotypes/alleles of the c.-441G>A – *FEN1* c.444T>G – *APEX1*, c.-468T>G – *APEX1* polymorphisms and FECD occurrence. Haplotypes of the g.61564299G>T, c.-441G>A of the *FEN1* gene were associated with FECD occurrence.

In conclusion, genetic variability of base excision repair genes may be important for KC and FECD occurrence.