

(20)

Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów *DGCR8* i *XPO5* oraz ich związek z występowaniem jaskry pierwotnej otwartego kąta

The analysis of single nucleotide polymorphisms of the DGCR8 and XPO5 genes, and their association with the incidence of primary open angle glaucoma

Milena Molasy¹, Anna Walczak¹, Karolina Przybyłowska-Sygut¹, Katarzyna Szymanek², Jerzy Szaflik², Jacek P. Szaflik³, Ireneusz Majsterek¹

¹ Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej, Wydział Wojskowo-Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek

² Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie

³ Katedra i Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek P. Szaflik

Abstrakt:

Cel: analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów szlaku obróbki miRNA: *DGCR8* i *XPO5*, oraz ich związek z występowaniem jaskry pierwotnej otwartego kąta.

Materiał i metody: materiał do badań stanowiła krew pobrana od chorych na jaskrę pierwotną otwartego kąta oraz od dopasowanej wiekowo grupy osób niedotkniętych tą chorobą. Liczebność grup dla rs3757 *DGCR8* w grupie kontrolnej wynosiła 135, w grupie badanej 137, dla rs11077 *XPO5* – 140 w grupie kontrolnej oraz 138 w grupie badanej. Z limfocytów krwi obwodowej został wyizolowany DNA. Oznaczenie częstości wariantów polimorficznych zostało przeprowadzone z wykorzystaniem zestawu TaqMan® SNP Genotyping Assays, który umożliwia odczyt genotypu podczas analizy reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym.

Wyniki: wyniki wykazały, że heterozygota AG polimorfizmu *DGCR8* rs3757 występowała głównie u osób, u których nie stwierdzono jaskry pierwotnej otwartego kąta ($P = 0,001$), homozygota GG natomiast dominowała u osób nią dotkniętych ($P = 0,003$). Nie wykazano istotnego statystycznie związku między występowaniem genotypów AC i CC polimorfizmu rs11077 w genie *XPO5* a ryzykiem wystąpienia jaskry pierwotnej otwartego kąta.

Wnioski: wiele doniesień wskazuje na związek między zmienionym poziomem miRNA a patogenezą jaskry. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genach *DGCR8* i *XPO5*, kodujących białka szlaku dojrzewania miRNA, mogą być kluczowe dla tego procesu. W przeprowadzonym badaniu wykazano, że genotyp AG polimorfizmu rs3757 *DGCR8* prawdopodobnie ma efekt protekcyjny, zmniejszający ryzyko zachorowania na jaskrę pierwotną otwartego kąta, genotyp GG natomiast może być związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania. Analiza pozostałych genów szlaku obróbki miRNA może pomóc w oznaczeniu wariantów polimorficznych związanych z podwyższonym ryzykiem wystąpienia jaskry pierwotnej otwartego kąta i zakwalifikowaniu bardziej podatnych na zachorowanie osób do grupy podwyższonego ryzyka.

Słowa kluczowe:

jaskra pierwotna otwartego kąta (JPOK), *DGCR8*, *XPO5*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu, miRNA.

Abstract:

Purpose: To analyse the single nucleotide polymorphisms of *DGCR8* and *XPO5* genes, involved in miRNA processing pathway, in relation to the incidence of primary open-angle glaucoma.

Material and methods: Blood samples as the biological material used for the experiment were voluntarily donated by patients with known primary open-angle glaucoma and age-matched healthy controls. The two control groups – rs3757 *DGCR8* and rs11077 *XPO5* – consisted of 135 and 140 volunteers, respectively. The two study groups – rs3757 *DGCR8* and rs11077 *XPO5* – consisted of 137 and 138 subjects, respectively. The polymorphic variant frequencies of rs3757 and rs1107 were determined using DNA isolated from the peripheral blood lymphocytes in TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Results: The statistical analysis revealed that the genotype AG of *DGCR8* rs3757 occurred more frequently in healthy individuals ($P = 0.001$), while homozygote GG was present mostly in people affected by primary open-angle glaucoma ($P = 0.003$). No association between the risk of primary open angle glaucoma and AC/CC genotypes of *XPO5* was found.

Conclusion: Many reports suggest the association between the miRNA alteration and the pathogenesis of glaucoma. The single nucleotide polymorphisms in *DGCR8* and *XPO5* genes, involved in microRNA biogenesis, may be the key factor in this process. Our experiment showed that genotype AG in rs3757 *DGCR8* exhibits protective effect, decreasing the risk of primary open angle glaucoma, while the homozygote GG is probably associated with increased risk of glaucoma. The analysis of polymorphic variants of the genes involved in miRNA biogenesis could enable identification of glaucoma high-risk groups.

Key words:

primary-open angle glaucoma (POAG), *DGCR8*, *XPO5*, single nucleotide polymorphism, miRNA.

Wstęp

Jaskra jest chorobą oczu, której etiologia nie jest do końca poznana (1). Jej początkowa faza może przebiegać bezobjawowo, wraz z jej postępem jednak chorzy zauważają ubytki w polu widzenia będące wynikiem rozwijającej się neuropatii nerwu wzrokowego (n. II). W skrajnych przypadkach lub w wyniku niepodjęcia leczenia może prowadzić do trwałej i nieodwracalnej utraty wzroku (2). Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) ta choroba jest jedną z najczęstszych przyczyn ślepoty na świecie. Najbardziej rozpowszechnioną formą jaskry jest jaskra pierwotna otwartego kąta (JPOK), która stanowi poważny problem we współczesnym społeczeństwie (1, 3). Liczba chorych na JPOK nieustannie rośnie, a prognozy nie są optymistyczne. Szacuje się, że w 2020 roku dotknie ona prawie 60 mln osób (4).

Molekularny mechanizm rozwoju JPOK nie został jak dotąd wyjaśniony. Dostępne dane pokazują, że jest to schorzenie dziedziczne (2). Do czynników, które zwiększają ryzyko zachowania na JPOK, można zaliczyć m.in. pokrewieństwo z osobami chorującymi na jaskrę, podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe (Intraocular Pressure – IOP) oraz krótkowzroczność (5). Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań potwierdzają, że prawdopodobieństwo rozwoju JPOK wzrasta wraz z wiekiem (6).

Zależność występowania JPOK od podwyższonego IOP, do którego dochodzi w wyniku zaburzeń odpływu cieczy wodnistej z oka, w literaturze medycznej opisano wielokrotnie (7–9). Nadmiar tej cieczy jest usuwany z oka przez sieć beleczkowania, którą wypełnia macierz zewnątrzkomórkowa (Extracellular Matrix – ECM) w kanale Schlemma oraz regionie struktur sitowych. Macierz zewnątrzkomórkową przebudowuje grupa białek, tzw. metaloproteinaz macierzowych (MMPs), których ekspresja jest kluczowa dla tworzenia jej prawidłowej struktury (10).

Wyniki wielu badań wskazują, że w procesie powstawania zmian neurodegeneracyjnych znaczący udział mają jednoniciowe cząsteczki RNA o długości około 21–23 nukleotydów (miRNA). Prawdopodobnie odgrywają one ważną rolę w rozwoju chorób Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona (11–13). Zmieniony poziom ekspresji miRNA jest również obserwowany jednocześnie ze zmianami ekspresji genów kluczowych w patogenezie jaskry, chociaż ten temat nie jest dobrze poznany (14, 15). Paylakhi i wsp. dokonali analizy genomu komórek ludzkiej sieci beleczkowania, była ona ukierunkowana na poszukiwania genów docelowych dla czynnika transkrypcyjnego Forkhead box C1 (FOXC1). Powszechnie uznaje się, że FOXC1 ma związek z rozwojem jaskry, ponieważ mutacje w tym genie powodują powstanie zespołu Axenfelda-Riegera, który często dotyka osoby na nią cierpiące. Przeprowadzone dotychczas doświadczenia pokazały, że miRNA-204 zmniejsza ekspresję FOXC1 oraz genów, z którymi łączy się ten czynnik transkrypcyjny – tj. *CLOCK*, *PLEKSHG5*, *ITGB1* oraz *MEIS2*. To sugeruje, że ekspresja genów w sieci beleczkowania jest regulowana w wyniku interakcji między FOXC1, ww. genami oraz miRNA, włączając miRNA-204. Ponadto uważa się, że miRNA może regulować poziom funkcjonalnych metaloproteinaz macierzowych, które są pośrednio odpowiedzialne za zachowanie odpowiedniego ciśnienia w oku (17). Przypuszcza się, że miRNA z rodziny miRNA-29 są zaangażowane w regulację ekspresji transformujących czynników beta (TGFβ), które kontrolują wzrost komórek, ich proliferację i apoptozę. Zmieniona ekspresja TGFβ jest jedną z cech, która często

towarzyszy jaskrze, ponieważ może ograniczać odpływ cieczy wodnistej z oka (18).

Na podstawie powyżej przytoczonych doniesień można wysnuć wniosek, że zaburzona ekspresja miRNA może odgrywać kluczową rolę w patogenezie JPOK. Główną przyczyną takich zmian mogą być nieprawidłowości w szlaku syntezy miRNA, które mogą wpływać na ilość dojrzałych miRNA zdolnych do posttranskrypcyjnej regulacji genów. Proces dojrzewania miRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym, tu długi pierwotny pri-miRNA jest poddawany cięciu przez tzw. „microprocessor complex” składający się z białek Drosha oraz DGCR8. Skutkuje to powstaniem prekursorowego pre-miRNA, który jest transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy przy udziale białek Eksportyny 5 (XPO5) i RanGTP, gdzie może ulec dalszej obróbce do dojrzałego miRNA.

Pojawienie się zmian polimorficznych w genach białek wpływających na dojrzewanie miRNA na tak wczesnym etapie może znacząco wpłynąć na ich ekspresję. Dlatego celem niniejszej pracy jest analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) genów szlaku obróbki miRNA – *DGCR8* (*DiGeorge critical region 8*) i *XPO5* (*Exportin5*) – oraz ich związek z występowaniem JPOK. W pracy przeanalizowano polimorfizmy o numerach rs3757 genu *DGCR8* oraz rs1107 *XPO5*. Te polimorfizmy są zlokalizowane w miejscu 3'UTR, które jest miejscem wiązania miRNA, w związku z tym SNP mogą mieć wpływ na efektywność dojrzewania miRNA (19, 20).

Materiały i metody

Materiał

Do badania zakwalifikowano chorych na JPOK, u których została ona potwierdzona – grupa badana, oraz osoby niedotknięte JPOK – grupa kontrolna. Liczebność grupy kontrolnej w odniesieniu do rs3757 *DGCR8* wynosiła $n = 135$, grupy badanej natomiast – $n = 137$ osób. Liczebność grupy kontrolnej w odniesieniu do rs11077 *XPO5* wynosiła $n = 140$, a grupy badanej $n = 138$. W przypadku polimorfizmu rs3757 analizie poddano 91 kobiet oraz 44 mężczyzn z grupy kontrolnej oraz 85 kobiet i 52 mężczyzn z grupy badanej. W przypadku polimorfizmu rs11077 grupa kontrolna liczyła 93 kobiety oraz 47 mężczyzn, w grupie badanej znalazło się 86 kobiet oraz 52 mężczyzn. Średni wiek pacjentów z grupy badanej wynosił 70 ± 14 lat, a osób z grupy kontrolnej 67 ± 16 lat. Wszyscy zakwalifikowani do badań zostali poddani kompleksowym badaniom okulistycznym, w tym: badaniu najlepiej skorygowanej ostrości wzroku, pomiarom IOP, badaniu z wykorzystaniem lampy szczelinowej oraz badaniu dna oka za pomocą gonioskopii bezdotykowej. Chorych na JPOK w czasie badania leczono typowymi lekami przeciwjaskrowymi, tj. beta-adrenolitykami, analogami prostaglandyn, inhibitorami anhidazy węglanowej i agonistami alfa-2. Z badania wykluczono osoby, które stosowały krople do oczu inne niż preparaty przeciwjaskrowe, przyjmowały glikokortykosteroidy, stosowały leki immunosupresyjne lub przeszły ogólnoustrojowe leczenie antybiotykami w ciągu 7 dni przed rozpoczęciem badania. Do grupy badanych wybrano pacjentów hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Klinicznym Szpitalu Okulistycznym w Warszawie (Katedry i Kliniki Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego). Pacjenci z badanej grupy i osoby z grupy kontrolnej zostali poinformowani o założeniach prowadzonego projektu naukowego i wyrazili pisemną zgodę na uczestnic-

two w nim. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły odłokciowej.

Izolowanie DNA

Próbki krwi pobrano do próbek z antykoagulantem (EDTA). DNA został wyizolowany z limfocytów krwi obwodowej – użyto zestawu do izolacji kwasu nukleinowego QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu przez producenta. Próbki po izolacji były przechowywane w temperaturze -20°C.

Oznaczenie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów

Oznaczenie częstości wariantów polimorficznych genów *DGCR8* (rs3757) i *XPO5* (rs1107) zostało przeprowadzone z wykorzystaniem zestawów TaqMan® SNP Genotyping Assays oraz TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Zestaw został dostarczony ze starterami i wyznakowanymi fluorescencyjnie sondami molekularnymi, które umożliwiają odczyt genotypu podczas analizy reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym. Oznaczenia zostały wykonane zgodnie z zaleceniami załączonymi przez producenta. Reakcja została przeprowadzona za pomocą systemu Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą oprogramowania STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Za pomocą testu Chi-kwadrat (χ^2) sprawdzono zgodność rozkładu genotypów z rozkładem Hardy’ego-Weinberga (HWE). Za pomocą testu χ^2 dokonano oceny istotności różnic między częstościami występowania genotypów u uczestników badania z poszczególnych grup. Za wyniki istotne statystycznie uznano te, dla których $P < 0,05$. Analiza statystyczna obejmowała także określenie ryzyka wystąpienia zdarzenia (iloraz szans, Odds Ratio – OR) oraz przedziału ufności (PU 95%) za pomocą modelu regresji liniowej.

Wyniki

Rozkłady genotypów u osób z grupy kontrolnej dla obu analizowanych genów był zgodny z prawem HWE. Otrzymane

wartości dla genu *DGCR8* (rs3757) wynosiły $\chi^2 = 3,516$, $P = 0,061$, dla genu *XPO5* (rs11077) były równe $\chi^2 = 3,455$, $P = 0,063$. U pacjentów z badanych grup odnotowano brak zgodności z prawem HWE – dla genu *DGCR8* (rs3757) $\chi^2 = 46,861$, $P < 0,001$, dla genu *XPO5* (rs11077) $\chi^2 = 12,586$, $P < 0,001$. Analiza wariantów polimorficznych *DGCR8* rs3757 (tab. I) wykazała, że u zdrowych osób z badanej grupy najczęściej występującym genotypem była heterozygota AG.

Znacznie mniejszą liczbę heterozygot oznaczono u chorych na zdiagnozowaną JPOK. Wyniki testu Chi-kwadrat wykazały, że genotyp AG ma wpływ na zmniejszenie ryzyka zachorowania na tę chorobę ($P = 0,001$) dla przedziału ufności równego 95%. U 137 pacjentów z badanej grupy dominującym genotypem dla genu *DGCR8* rs3757 była homozygota GG. Ponad dwukrotnie mniejsza liczba homozygot GG została zidentyfikowana u osób z grupy kontrolnej. Analiza statystyczna wskazała, że u przebadanej populacji genotyp GG ma istotny statystycznie związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na JPOK ($P = 0,003$) w przedziale ufności równym 95%. Dla polimorfizmu genu *XPO5* o numerze rs11077 najczęściej występującymi genotypami były: u osób z grupy kontrolnej – heterozygota AC, u pacjentów z badanej grupy natomiast – homozygota AA będąca genotypem referencyjnym. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między zmienionym ryzykiem zachorowania na JPOK a występowaniem genotypów AC oraz CC w przedziale ufności 95%. Do badania zakwalifikowano nierównoliczne grupy kobiet i mężczyzn. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między częstością występowania poszczególnych wariantów genetycznych genów *DGCR8* oraz *XPO5* w zależności od płci.

Wnioski

Choroby neurodegeneracyjne stanowią poważny problem, ponieważ dotyczą wielu osób, a jak dotąd nie opracowano skutecznej metody ich leczenia. Dotyczy to zarówno chorób obejmujących komórki nerwowe w mózgu, takich jak choroby Alzheimera i Parkinsona, jak i jaskry, w przebiegu której dochodzi do neuropatii nerwu wzrokowego. Według doniesień z dostępnej literatury medycznej w patogenezie ww. chorób, które w początkowych stadiach rozwijają się bez objawów, prawdopodobny jest udział miRNA (11, 21). Nieprawidłowe dojrzewa-

Gen (nr rs)/ Gene (rs number)	Genotyp/ Genotype	Grupa kontrolna/ Control group	Pacjenci/ Patients	Iloraz szans/ Odds ratio	Przedział ufności 95%/ 95% Confidence interval	P
<i>DGCR8</i> (3757)	AA	20	18	Ref.		
	AG	77	18	0,26	0,115–0,589	0,001
	GG	38	101	2,953	1,412–6,177	0,003
<i>XPO5</i> (11077)	AA	41	49	Ref.		
	AC	59	48	0,68	0,388–1,196	0,18
	CC	40	41	0,858	0,47–1,565	0,617

Tab. I. Zbiornicze wyniki analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów *DGCR8* (rs3757) i *XPO5* (rs11077) oraz ich związek z występowaniem jaskry pierwotnej otwartego kąta.

P – prawdopodobieństwo
Ref. – genotyp referencyjny

Tab. I. Single Nucleotide Polymorphisms of *DGCR8* (rs3757) and *XPO5* (rs11077) genes and their association with the incidence of primary open angle glaucoma – summarized results of analysis.

P – probability
Ref. – reference.

nie miRNA może rzutować na mechanizm wyciszania genów przeprowadzany przez miRNA, dlatego analizie zostały poddane warianty polimorficzne w genach *DGCR8* oraz *XPO5*.

Białka kodowane przez geny *DGCR8* oraz *XPO5* biorą bezpośredni udział w szlaku dojrzewania i obróbki miRNA. Geny kodujące miRNA są transkrybowane w jądrze komórkowym przez polimerazę III RNA. W wyniku tego procesu powstaje kilkusetnukleotydowy pierwotny transkrypt zwany primary-RNA (pri-miRNA). Pri-miRNA następnie jest cięty przez RNAazę III Drosha z udziałem białka DGCR8, którego funkcją jest wskazywanie miejsca przecięcia nici pri-miRNA. Powstały prekursorowy miRNA (pre-miRNA) jest rozpoznawany przez XPO5 oraz aktywnie transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy przez białkowy kompleks Ran-GTP. Z udziałem enzymu Dicer w cytozolu powstaje dojrzały dwuniciowy miRNA o długości 19–24 nukleotydów, wchodzi on w skład białkowo-nukleotydowego kompleksu RISC i jest zdolny do regulowania ekspresji genów (22, 23).

Opracowanie skutecznej terapii oraz profilaktyka schorzeń, w przebiegu których następuje degradacja neuronów, jest dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny i środowiska naukowego. Uważa się, że zastosowanie miRNA w leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych może chorym na nie dać nadzieję na poprawę jakości życia i stanu zdrowia (24). Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów została opisana w doniesieniach naukowych jako metoda przydatna w diagnostyce guzów nabłonkowych nerek (25), raka piersi oraz innych nowotworów (26, 27), diagnostyce płodu (28) czy też choroby Alzheimera (29). Przeprowadzona przez nas analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genów *DGCR8* i *XPO5* wskazała, że polimorfizm GG rs3757 w genie *DGCR8* prawdopodobnie wpływa na podwyższenie ryzyka zachorowania na JPOK, podczas gdy wariant polimorficzny AG tego samego genu wykazuje potencjalne właściwości protekcyjne, mogące zapobiegać powstaniu tej choroby lub ograniczać jej rozwój. Polimorfizm rs3757 usytuowany w regionie 3'UTR, a „knock-out” genu *DGCR8*, wiąże się z zaburzeniami obróbki miRNA wywołującymi kancerogenezę (30). Dostępne dane literaturowe wskazują, że genotypy AG i GG mogą mieć wpływ na zwiększenie ryzyka wystąpienia chorób neuropsychiatrycznych takich jak schizofrenia (31) i depresja (32). Nie udowodniono, aby polimorfizm rs3757 przyczyniał się do powstania przewlekłego zapalenia wątroby typu B (33), raka przełyku (34) i raka nerkowokomórkowego (35).

W naszych badaniach nie wykazano związku polimorfizmu rs11077 z JPOK. Brak jest doniesień o związku tego polimorfizmu z jaskrą czy innymi chorobami neurodegeneracyjnymi. W piśmiennictwie naukowym brakuje doniesień nt. wpływu tego polimorfizmu na powstawanie jaskry i innych chorób neurodegeneracyjnych, wykazano natomiast, że jest on usytuowany w regionie 3'UTR. Genotyp CC był związany z obniżoną ekspresją genu reporterowego Renilla, to sugeruje, że obecność tego genotypu może wpływać na stabilność genu *XPO5* i obniżyć jego ekspresję, a przez to także ekspresję miRNA (36). Rola tego polimorfizmu w patogenezie wielu chorób nie jest jednoznaczna. Udowodniono, że polimorfizm rs11077 może się przyczyniać do powstania niedrobnokomórkowego raka płuc (37) i przyspieszać menopauzę (38). Nie potwierdzono w badaniach, aby polimorfizm genu *XPO5* miał udział w indukowaniu

raka jelita grubego (39) oraz chłoniaka nieziarniczego (40). Co więcej, genotypy AC i CC miały wpływ na wydłużenie czasu całkowitego przeżycia po autonomicznym przeszczepie komórek macierzystych w terapii szpiczaka mnogiego (36).

Na niezgodność rozkładu częstości genotypów z prawem HWE mogą wpływać zarówno zmiany ewolucyjne zachodzące w populacji pacjentów, jak i zmiany polimorficzne w obrębie genu predysponujące do rozwoju choroby i przyczyniające się do zmiany ekspresji genu lub indukcji określonego fenotypu.

W przyszłości wyniki oceny istotności różnic w częstościach występowania genotypów w poszczególnych grupach chorych mogą być wykorzystywane do wczesnej diagnostyki jaskry pierwotnej otwartego kąta oraz pomocne w jej profilaktyce, dzięki temu, że mogą stać się swoistym kryterium decydującym o kwalifikacji określonych osób do grupy podwyższonego ryzyka.

Praca została sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2012/05/B/NZ7/02502 oraz przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z zadania badawczego nr 502-03/5-108-05/502-54-164.

Piśmiennictwo:

1. Carnes MU, Liu YP, Allingham RR, Whigham BT, Havens S, Garrett ME, et al.: *Discovery and functional annotation of SIX6 variants in primary open-angle glaucoma*. PLOS Genetics. 2014; 10(5): e1004372.
2. Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ: *The genetics of primary open-angle glaucoma: a review*. Experimental Eye Research. 2009; 88(4): 837–844.
3. Nowak A, Majsterek I, Przybyłowska-Sygut K, Pytel D, Szymanek K, Szaflik J, et al.: *Analysis of the Expression and Polymorphism of APOE, HSP, BDNF, and GRIN2B Genes Associated with the Neurodegeneration Process in the Pathogenesis of Primary Open Angle Glaucoma*. Biomed Research International. 2015; 2015.
4. Quigley HA, Broman AT: *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. British Journal of Ophthalmology. 2006; 90(3): 262–267.
5. de Voogd S, Ikram MK, Wolfs RC, Jansonius NM, Hofman A, de Jong PT: *Incidence of open-angle glaucoma in a general elderly population: the Rotterdam Study*. Ophthalmology. 2005; 112(9): 1487–1493.
6. Leske MC, Connell A, Wu S-Y, Hyman LG, Schachat AP: *Risk factors for open-angle glaucoma: the Barbados Eye Study*. Archives of Ophthalmology. 1995; 113(7): 918–924.
7. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA: *The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*. JAMA. 2014; 311(18): 1901–1911.
8. Luna C, Li G, Huang J, Qiu J, Wu J, Yuan F, et al.: *Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c*. PLOS ONE 2012; 7(12): e51688.
9. Nowak A, Szaflik JP, Gacek M, Przybyłowska-Sygut K, Kamińska A, Szaflik J, et al.: *BDNF and HSP gene polymorphisms and their influence on the progression of primary open-angle glaucoma in a Polish population*. Arch Med Sci. 2014; 10(6): 1206.
10. Markiewicz L, Pytel D, Mucha B, Szymanek K, Szaflik J, Szaflik JP, et al.: *Altered Expression Levels of MMP1, MMP9,*

- MMP12, TIMP1, and IL-1 as a Risk Factor for the Elevated IOP and Optic Nerve Head Damage in the Primary Open-Angle Glaucoma Patients*. Biomed Research International. 2015; 2015.
11. Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y: *The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases*. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013; 7:265.
 12. Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahland KJ, Cowana C, Turturroa S, et al.: *Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013; 110(6): 507–516.
 13. Andreeva K, Cooper NG: *MicroRNAs in the Neural Retina*. International Journal of Genomics. 2014; 2014.
 14. Arora A, Guduric-Fuchs J, Harwood L, Dellett M, Cogliati T, Simpson DA: *Prediction of microRNAs affecting mRNA expression during retinal development*. BMC Developmental Biology. 2010; 10(1): 1.
 15. Baudet M-L, Zivraj KH, Abreu-Goodger C, Muldal A, Armisen J, Blenkiron C, et al.: *miR-124 acts through CoREST to control onset of Sema3A sensitivity in navigating retinal growth cones*. Nature Neuroscience. 2012; 15(1): 29–38.
 16. Paylakhi SH, Moazzeni H, Yazdani S, Rassoulie P, Arefianf E, Jaberie E, et al.: *FOXC1 in human trabecular meshwork cells is involved in regulatory pathway that includes miR-204, MEIS2, and ITGβ1*. Exp Eye Res. 2013; 111: 112–121.
 17. Surgucheva I, Chidambaram K, Willoughby DA, Surguchov A: *Matrix metalloproteinase 9 expression: new regulatory elements*. Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics. 2010; 3(2): 41–52.
 18. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P: *Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2011; 52(6): 3567.
 19. Liu S, An J, Lin J, Liu Y, Bao L, Zhang W, et al.: *Single nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes and outcome of hepatocellular carcinoma*. PLOS ONE. 2014; 9(3): e92791.
 20. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X: *Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer*. Cancer Res. 2008; 68(7): 2530–2537.
 21. Gascon E, Gao F-B: *Cause or effect: misregulation of microRNA pathways in neurodegeneration*. Frontiers in Neuroscience. 2012; 6: 48.
 22. Bartel DP: *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell. 2004; 116(2): 281–297.
 23. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nature Cell Biology. 2009; 11(3): 228–234.
 24. Junn E, Mouradian MM: *MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential*. Pharmacology & Therapeutics. 2012; 133(2): 142–150.
 25. Hagenkord JM, Parwani AV, Lyons-Weiler MA, Alvarez K, Amato R, Gatalica Z, et al.: *Virtual karyotyping with SNP microarrays reduces uncertainty in the diagnosis of renal epithelial tumors*. Diagn Pathol. 2008; 3(1): 44.
 26. Tempfer CB, Hefler LA, Schneeberger C, Huber JC: *How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer?* Gynecological Endocrinology 2006; 22(3): 155–159.
 27. Bernig T, Chanock SJ: *Challenges of SNP genotyping and genetic variation: its future role in diagnosis and treatment of cancer*. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2006; 6(3): 319–331.
 28. Stoughton R, Kapur R, Cohen B: *Use of highly parallel snp genotyping for fetal diagnosis*. 2007.
 29. Kamboh M, Demirci F, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, et al.: *Genome-wide association study of Alzheimer's disease*. Translational Psychiatry. 2012; 2(5): e117.
 30. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T: *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. Nature Genetics. 2007; 39(5): 673–677.
 31. Zhou Y, Wang J, Lu X, Song X, Ye Y, Zhou J, et al.: *Evaluation of six SNPs of MicroRNA machinery genes and risk of schizophrenia*. Journal of Molecular Neuroscience. 2013; 49(3): 594–599.
 32. He Y, Zhou Y, Xi Q, et al.: *Genetic variations in microRNA processing genes are associated with susceptibility in depression*. DNA and Cell Biology. 2012; 31(9): 1499–1506.
 33. Shang M, Huang Y, Hu X, Wang J, Song X, Zhou Y, et al.: *Association between SNPs in miRNA-machinery genes and chronic hepatitis B in the Chinese Han population*. Infection, Genetics and Evolution. 2014; 28: 113–117.
 34. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al.: *Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk*. Cancer Prevention Research. 2008; 1(6): 460–469.
 35. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, et al.: *Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma*. Clinical Cancer Research. 2008; 14(23): 7956–7962.
 36. de Larrea CF, Navarro A, Tejero R, Tovar N, Díaz T, Cibeira MT, et al.: *Impact of MiRSNPs on survival and progression in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation*. Clinical Cancer Research. 2012; 18(13): 3697–3704.
 37. Ding C, Li C, Wang H, Guo Z: *A miR-SNP of the XPO5 gene is associated with advanced non-small-cell lung cancer*. Onco Targets Ther. 2013; 6: 877–881.
 38. Rah H, Jeon YJ, Lee BE, Kim JO, Shim SH, Lee WS, et al.: *Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women*. Menopause. 2013; 20(10): 1067–1073.
 39. Zhao Y, Du Y, Zhao S, Guo Z: *Single-nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes and risk of colorectal cancer*. Oncotargets and Therapy. 2015; 8: 421.
 40. Gao Y, Diao L, Li H, Guo Z: *Single nucleotide polymorphisms of microRNA processing genes and outcome of non-Hodgkin's lymphoma*. Oncotargets and Therapy. 2015; 8: 1735.

Praca wpłynęła do Redakcji 14.08.2015 r. (KO-00022-2015) |
Zakwalifikowano do druku 22.04.2016 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Wydział Wojskowo-Lekarski UM w Łodzi
Plac Hallera 1
90-647 Łódź
e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl