

1 STRESZCZENIE

Choroba Alzheimerera (AD) jest chorobą neurodegeneracyjną, wieloczynnikową i wielogenową. Na jej rozwój mogą mieć wpływ nie tylko polimorfizmy genetyczne, ale także czynniki pozagenowe (epigenetyczne), na przykład metylacja w obrębie dinukleotydów CpG. Za rozwój choroby Alzheimerera odpowiadają także czynniki środowiskowe oraz styl życia danej osoby.

Najczęstszą postacią AD jest postać o późnym początku, która występuje u osób w wieku powyżej lub równym 65 lat. Mówimy wówczas o sporadycznej postaci choroby Alzheimerera (SAD) lub o późnej postaci AD (LOAD). Za rozwój wczesnej postaci choroby (EOAD), gdy objawy pojawiają się przed 60. r.ż. odpowiadają czynniki genetyczne. Jest to postać AD, która występuje rodzinnie i jest dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. AD dzielimy na następujące stadia zaawansowania: MCI – łagodne zaburzenia poznawcze (predemencja), AD I – łagodne otępienie, AD II – umiarkowane otępienie i AD III – głębokie otępienie. Najsilniejszym, bezspornym czynnikiem ryzyka wystąpienia AD jest wiek powyżej 65. r.ż.

Celem niniejszej rozprawy było zaprojektowanie i przeprowadzenie badań molekularnych, które dałyby odpowiedź na postawioną hipotezę, że: poziom metylacji DNA oraz obecność danych polimorfizmów genetycznych mają wpływ na rozwój choroby Alzheimerera.

Grupa zakwalifikowana do badań składała się z 223. osób. Grupa kontrolna to 62. osoby bez objawów i diagnozy AD, dobrane wiekowo odpowiednio do wieku osób z grupy badanej. Analizowana grupa badana to 161 osób z potwierdzonym otępieniem. W tym 53 osoby ze zdiagnozowanym MCI oraz 108 osób w różnych stadiach demencji typu AD: AD I – 50 osób, AD II – 48 osób, AD III – 10 osób.

Do badań molekularnych wykorzystano genomowe DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej. W celu amplifikacji fragmentów genów z badanymi polimorfizmami genetycznymi zastosowano klasyczną technikę PCR (ang. polymerase chain reaction) lub technikę PCR – RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism). W niniejszej rozprawie przeprowadzono analizę częstości występowania wybranych polimorfizmów genetycznych zlokalizowanych w genach: *APOE*, *APOC1*, *TOMM40*, które znajdują się na chromosomie 19. oraz częstość występowania polimorfizmu genu *ACE* znajdującego się na chromosomie 17. W badanej grupie osób stwierdzono przewagę procentowego udziału

genotypu $\epsilon 3/\epsilon 3$ w analizie polimorfizmów rs429358 i rs7412 genu *APOE*. Wśród osób z genotypem $\epsilon 3/\epsilon 4$ stwierdzono podwyższony iloraz szans zachorowania o 3,539 razy. Najsilniejszym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju otępienia w sporadycznej formie AD była obecność allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* w genotypie chorego, która zwiększała iloraz szans wystąpienia otępienia o około 4,3 razy. Największy procentowy udział występowania tego allelu stwierdzono u osób chorych w stadium AD I i AD II. W kolejnym analizowanym polimorfizmie stwierdzono, że allel insercyjny (I) w rs11568822 genu *APOC1* zwiększał iloraz szans wystąpienia AD o 4,2 razy. W genotypie heterozygotycznym stwierdzono podwyższony iloraz szans OR=3,14 razy. Przeanalizowano również częstość występowania polimorfizmu rs10524523 genu *TOMM40* w badanej grupie osób. Uzyskano dane, z których wynika, że obecność allelu S w genotypie prawdopodobnie ma działanie ochronne przed wystąpieniem choroby Alzheimera, ale tylko w układzie homozygotycznym: S/S. Obecność allelu L tego genu w genotypie osób badanych zwiększała prawdopodobieństwo wystąpienia otępienia alzheimerowskiego o 3 razy. W grupie osób chorych allel ten występował głównie w AD I i AD II w układach genotypów: S/L, L/L i L/VL. W badanym wariantcie polimorficznym genu *TOMM40* istotną rolę odgrywała także różnica w długości homopolimeru poli-T pomiędzy allelami homologicznymi. Im większa była różnica pomiędzy liczbą nukleotydów w chromosomach homologicznych w badanym genotypie tym cięższa była postać choroby. Podczas analizy polimorfizmu rs1799752 genu *ACE*, stwierdzono, że obecność allelu insercyjnego (I) zwiększała szanse wystąpienia AD 1,66 razy. Jednak na podstawie wykonanych badań nie było możliwości wykazania w jakim układzie genetycznym występowało to zagrożenie. Natomiast na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że najwięcej osób z otępieniem posiadało genotyp ID wśród wszystkich możliwych genotypów badanego polimorfizmu genu *ACE*.

Analizy przeprowadzone na wyodrębnionej podgrupie osób młodych, u których otępienie stwierdzono ≤ 60 . r.ż. wykazały podobne wyniki jak powyżej. Dla częstości występowania polimorfizmów rs429358 i rs7412 genu *APOE* stwierdzono także przewagę udziału procentowego genotypu $\epsilon 3/\epsilon 3$. Wśród młodych chorych osób z genotypem $\epsilon 3/\epsilon 4$ stwierdzono podwyższony iloraz szans wystąpienia AD prawie o 5 razy. Najsilniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby EOAD była obecność allelu $\epsilon 4$ genu *APOE* w genotypie badanych osób. Wtedy iloraz szans zwiększał się prawie o 6 razy. W przypadku analizy częstości obecności polimorfizmu rs11568822 genu *APOC1*, obecność allelu I zwiększała szanse wystąpienia AD u badanych osób o 2,88 razy. Podwyższony iloraz szans

wystąpienia AD, bo ponad 3 razy uzyskano dla występowania w genotypie allelu L formy polimorfizmu rs10524523 genu *TOMM40*. Natomiast w analizie statystycznej genotypu homozygotycznego L/L wyżej opisanego polimorfizmu genu ryzyko wystąpienia AD u badanych osób wynosiło $OR = 5,9$ razy. W analizie częstości obecności polimorfizmu rs1799752 genu *ACE* stwierdzono podwyższony iloraz szans wystąpienia AD dla obecności allelu I o 4,8 razy, ale nie uzyskano informacji w jakim genotypie może zachodzić takie ryzyko.

W analizach zależności pomiędzy genami, w których brano pod uwagę tylko genotypy lub allele, dla których stwierdzono podwyższony iloraz szans wystąpienia otępienia, w żadnym układzie genotypów i haplotypów nie stwierdzono spodziewanego wyniku „p” istotnego statystycznie.

Analiza poziomu względnej metylacji w promotorach genów: *APOE*, *TOMM40* i *ACE* była następnym etapem rozprawy. Doświadczenia przeprowadzono metodą qMSP-PCR (ang. Quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) z wykorzystaniem DNA genomowego z leukocytów krwi pełnej. Zamierzeniem analiz molekularnych było wykazanie istniejących różnic w poziomach względnej metylacji pomiędzy osobami stanowiącymi grupę kontrolną a osobami tworzącymi grupę badaną z otępieniem. Na podstawie uzyskanych wyników analizy względnej metylacji w promotorze genu *APOE* stwierdzono, że poziom metylacji spada we wczesnym stadium AD, natomiast wraz z zaawansowaniem choroby następuje nasilenie metylacji aż do wartości liczbowej takiej jak w grupie kontrolnej. Podczas analizy poziomu metylacji w promotorze genu *TOMM40* nie zaobserwowano występującej zależności pomiędzy względną wartością metylacji w promotorze genu *TOMM40* a występowaniem lub brakiem otępienia u osób badanych. Statystyczna analiza z podziałem na możliwe stadia otępienia przedstawiła tylko możliwą tendencję do rozróżnienia grupy osób z AD II od pozostałych form otępienia. Wykazano także, że wraz z wiekiem wzrastała wartość względnej metylacji w promotorze tego genu. Nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem metylacji w promotorze genu *ACE* a zaawansowaniem AD. Zaobserwowano jednak ujemną korelację pomiędzy wiekiem pacjenta a względną metylacją. Znaczący to, że wraz z wiekiem chorego obniża się wartość względnej metylacji w promotorze genu *ACE*.

W wyniku przeprowadzonych analiz możliwych zależności pomiędzy względną metylacją w promotorach wybranych genów (*APOE*, *TOMM40* i *ACE*) a obecnością badanych polimorfizmów danych genów (*APOE*, *APOC1*, *TOMM40* i *ACE*) w różnych możliwych kombinacjach, nie uzyskano żadnych współistniejących korelacji pomiędzy względną metylacją a genotypem i ich możliwym wpływem na występowanie otępienia. Stwierdzono

natomiast, że choroby powiązane z podeszłym wiekiem, takie jak nadciśnienie i hiperlipidemia mogą mieć wpływ na rozwój lub progresję otępienia typu alzheimerowskiego. U osób młodych, przed 65. r.ż., taki wpływ zauważono u ludzi ze zdiagnozowaną depresją i hiperlipidemią. W przypadku występowania nadciśnienia w młodym wieku, stwierdzono, że nie wpływa ono na rozwój AD w postaci EOAD.

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że występowanie pewnych polimorfizmów genetycznych oraz zmiany w poziomie metylacji DNA mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju AD. Konieczne są dalsze badania na większej grupie chorych w celu potwierdzenia wpływu mechanizmów genetycznych i epigenetycznych na rozwój choroby otępiennej oraz jej przebieg