

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego PAN

mgr Mariusz Berdyński

**BADANIE PODŁOŻA GENETYCZNEGO
OTEPIENIA CZOŁOWO-SKRONIOWEGO
I
STWARDNIENIA ZANIKOWEGO BOCZNEGO**

Praca doktorska wykonana w Zespole Kliniczno-Badawczym Chorób
Zwyrodnieniowych CUN IMDiK PAN

Promotor:

prof. dr hab. Cezary Żekanowski

Warszawa, 2014

Wyniki zamieszczone w rozprawie zostały częściowo opublikowane w niniejszych artykułach:

Gabryelewicz T., Masellis M., **Berdynski M.***, Bilbao J.M., Rogaeva E., St George Hyslop P., Barczak A., Czyzewski K., Barcikowska M., Wszolek Z., Black SE., Zekanowski C.: Intra-familial clinical heterogeneity due to FTL-D-U with TDP-43 proteinopathy caused by a novel deletion in progranulin gene (PGRN). *J Alzheimers Dis.* 2010;22(4):1123-33. * jeden z trzech pierwszych równorzędnych autorów.

Berdynski M., Kuźma-Kozakiewicz M., Ricci C., Kubiszewska J., Millecamps S., Salachas F., Łusakowska A., Carrera P., Meininger V., Battistini S., Kwieciński H., Zekanowski C.: Recurrent G41S mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene (SOD1) causing familial amyotrophic lateral sclerosis in a large Polish family. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012;13(1):132-6.

Sitek E., Barczak A., Narożańska E., Chodakowska-Żebrowska M., Jasińska-Myga B., Brockhuis B., **Berdynski M.**, Wieczorek D., Żekanowski C., Konieczna S., Barcikowska M., Wszolek Z., Sławek J.: The role of neuropsychological assessment in the detection of early symptoms in Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to chromosome 17 (FTDP 17). *Acta Neuropsychol* 2011; 9(2):209-226.

Sitek E.J., Narożanska E., Barczak A., Jasinska-Myga B., Harciarek M., Chodakowska Zebrowska M., Kubiak M., Wieczorek D., Konieczna S., Rademakers R., Baker M., **Berdynski M.**, Brockhuis B., Barcikowska M., Zekanowski C., Heilman K.M., Wszolek Z.K., Sławek J.: Agraphia in patients with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 with P301L MAPT mutation: dysexecutive, aphasic, apraxic or spatial phenomenon? *Neurocase.* 2014;20(1):69-86.

Iyer A., Lapointe N.E., Zielke K., **Berdynski M.***, Guzman E., Barczak A., Chodakowska-Żebrowska M., Barcikowska M., Feinstein S., Zekanowski C.: A novel MAPT mutation, G55R, in a frontotemporal dementia patient leads to altered Tau function. *PLoS One.* 2013;8(9):e76409.* jeden z czterech pierwszych równorzędnych autorów

Kuźma-Kozakiewicz M., **Berdyński M.**, Morita M., Takahashi Y., Kawata A., Kaida K., Kaźmierczak B., Lusakowska A., Goto J, Tsuji S, Zekanowski C, Kwieciński H.: Recurrent K3E mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013;14(7-8):608-14.

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, Profesorowi Cezaremu Żekanowskiemu, za umożliwienie wykonania pracy, opiekę merytoryczną, pomoc i wsparcie w trakcie realizacji badań.

Serdecznie dziękuję Profesor Marii Barcikowskiej za cenne wskazówki i konsultacje oraz opiekę w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Serdecznie dziękuję Profesorowi Sławomirowi Filipkowi, za nieocenioną pomoc w modelowaniu struktury białka SOD1.

Serdecznie dziękuję Profesor Ewie Bartnik i Profesor Magdalenie Kuźmie-Kozakiewicz, za wiele cennych uwag i wskazówek.

Realizacja opisanych tutaj badań nie byłaby możliwa bez lekarzy i neuropsychologów, którzy brali udział w doborze i ewaluacji grup badanych. Chciałabym szczególnie serdecznie podziękować Doktor Marii Styczyńskiej, Doktor Annie Barczak z IMDiK PAN oraz Wszystkim Pracownikom Poradni Alzheimerowskiej Szpitala MSW w Warszawie

Dziękuję także Wszystkim obecnym i wcześniejszym Członkom naszego Zespołu – za miłą współpracę, dyskusje i nieocenioną pomoc.

Dziękuję mojej Rodzinie za wiarę we mnie i ogromne wsparcie.

Szczególne podziękowania składam żonie Zuzannie oraz synom - za bezcenną i wielopłaszczyznową pomoc oraz za cierpliwość.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	9
1 WSTĘP	11
1.1 Otępienie czołowo-skroniowe	15
1.1.1 Fenotyp kliniczny	15
1.1.2 Epidemiologia	17
1.1.3 Cechy neuropatologiczne	17
1.1.4 Genetyka FTD	18
1.2 Stwardnienie zanikowe boczne	23
1.2.1 Fenotyp kliniczny	23
1.2.2 Cechy neuropatologiczne	24
1.2.3 Epidemiologia	24
1.3 FTD-ALS	27
2 CEL PRACY	29
3 PACJENCI, MATERIAŁY I METODY	30
3.1 Badane grupy chorych	30
3.1.1 Pacjenci z fenotypem FTD	30
3.1.2 Pacjenci z fenotypem ALS	31
3.1.3 Grupa kontrolna	32

3.2	Zastosowane techniki	32
3.2.1	Izolacja DNA oraz RNA	33
3.2.2	Analiza spektrofotometryczna DNA i RNA	33
3.2.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	33
3.2.4	Rozdział elektroforetyczny	34
3.2.5	Oczyszczanie produktów PCR.....	34
3.2.6	Bezpośrednie sekwencjonowanie fluorescencyjne	35
3.2.7	Analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych	35
3.2.8	Analiza haplotypu <i>MAPT</i>	35
3.2.9	Określenie genotypu otwartej ramki odczytu <i>C9ORF72</i>	36
3.2.10	Genotypowanie <i>SOD1</i>	36
3.2.11	Genotypowanie z zastosowaniem analizy dyskryminacji alleli (sondy TaqMan)	37
3.2.12	Analiza ekspresji mRNA <i>PGRN</i> w leukocytach krwi obwodowej.....	37
3.2.13	Analiza statystyczna.....	38
3.2.14	Zastosowane programy do analizy <i>in silico</i> nowych wariantów w sekwencji DNA	39
3.2.15	Modelowanie zmutowanej struktury białka SOD1	39
	WYNIKI	40
4.1	Otępienie czołowo-skroniowe (FTD).....	40
4.1.1	Gen <i>MAPT</i>	42
4.1.2	Gen <i>PGRN</i>	45

4.1.3	Gen <i>C9ORF72</i>	50
4.2	Stwardnienie zanikowe boczne (ALS).....	50
4.2.1	Gen <i>SOD1</i>	51
4.2.2	Gen <i>C9ORF72</i>	57
4.3	Analiza genu <i>C9ORF72</i>	58
4.4.	Analiza możliwego znaczenia fenotypowego dwóch wybranych polimorfizmów genu <i>PGRN</i> w FTD i ALS.....	60
4.4.1	Polimorfizm rs850713 (17:42427732G>A) <i>PGRN</i>	60
4.4.2	Polimorfizm rs5848 (17:42430244C>T) <i>PGRN</i>	61
4.4.3	Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs580713 i rs5848 w genie <i>PGRN</i>	62
5	DYSKUSJA.....	64
6	WNIOSKI.....	73
7	STRESZCZENIE	74
8	ABSTRACT	76
9	SPIS RYCIN.....	78
10	SPIS TABEL	80
11	SUPLEMENT	81
12	PIŚMIENNICTWO	86

WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Oryginalna nazwa w języku angielskim, od której pochodzi skrót
6-FAM	6-karboksylo-fluoresceina	<i>6-carboxyfluorescein</i>
AD	choroba Alzheimera	<i>Alzheimer's disease</i>
ALS	stwardnienie zanikowe boczne	<i>amyotrophic lateral sclerosis</i>
APOE	apolipoproteina E	<i>apolipoprotein E</i>
APOE2	allel e2 apolipoproteiny E	<i>apolipoprotein E e2 Allele</i>
APOE4	allel e4 apolipoproteiny E	<i>apolipoprotein E e4 Allele</i>
BIBD	choroba wtrętów zasadowych	<i>basophilic inclusion body disease</i>
bvFTD	behawioralny wariant otępienia czołowo-skroniowego	<i>behavioural variant frontotemporal dementia</i>
CBD	Zwyrodnienie korowo-podstawne	<i>corticobasal syndrome</i>
CHMP2B	białko CHMP2B	<i>charged multivesicular body protein 2B</i>
D	miara nierównowagi sprzężeń	<i>disequilibrium</i>
D'	D' Levotina (znormalizowana wartość D)	<i>Lewontin's D' (normalized D value)</i>
DEPC	eter dietylowy kwasu pirowęglowego	<i>diethylpyrocarbonate</i>
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMG	elektromiografia	
FTD	otępienie czołowo-skroniowe	<i>frontotemporal dementia</i>
FTLD	zwyrodnienie czołowo-skroniowe	<i>frontotemporal lobar degeneration</i>
FUS	białko FUS wiążące RNA	<i>FUS RNA binding protein</i>
GWAS	analiza asocjacyjna w skali całego genomu	<i>genome-wide association study</i>
IBM	wtrętowe zapalenie mięśni	<i>inclusion body myositis</i>
LD	nierównowaga sprzężeń	<i>linkage disequilibrium</i>
MND	choroba neuronu ruchowego	<i>motor neuron diseases</i>
NIFID	choroba z ciałami wtrętowymi neurofilamentów	<i>neuronal intermediate filament inclusion disease</i>
PBP	postępujące porażenie opuszkowe	<i>progressive bulbar palsy</i>
PLS	pierwotne stwardnienie boczne	<i>primary lateral sclerosis</i>
PPA	pierwotna afazja postępująca	<i>primary progressive aphasia</i>

PSP	postępujące porażenie nadjądrowe	<i>progressive supranuclear palsy</i>
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych	<i>restriction fragments length polymorphism</i>
RT-qPCR	ilościowa PCR z odwrotną transkryptazą	<i>reverse transcriptase quantitative PCR</i>
SD	otępienie semantyczne	<i>semantic dementia</i>
SNP	pojedyncze podstawienie jednonukleotydowe	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD1	cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej 1	<i>superoxide dismutase 1</i>
TAMRA	6-karboksylotetrametylorodamina	<i>6-carboxy-tetramethylrhodamine</i>
TBE	tris-boran-EDTA	<i>tris-borate-EDTA</i>
TDP43	białko TAR-43 wiążące DNA	<i>TAR DNA binding protein</i>
TET	tetrachloro-6-karboksyl-fluoresceina	<i>tetra-chloro-6-carboxyfluorescein</i>
Tris	(hydroksymetylo) aminometan	<i>(hydroxymethyl)-amino-methane</i>
UTR	nie ulegający translacji obszar mRNA	<i>untranslated region</i>
VCP	białko obejmujące walozyne	<i>valosin containing protein</i>
WES	sekwencjonowanie całego eksomu	<i>whole exome sequencing</i>
WGS	sekwencjonowanie całego genomu	<i>whole genome sequencing</i>

1 WSTĘP

Choroby neurodegeneracyjne są wynikiem stopniowego i postępującego zaniku komórek nerwowych, prowadzącego do dysfunkcji centralnego lub obwodowego układu nerwowego. Wspomniany termin obejmuje szerokie spektrum chorób takich jak: choroba Alzheimera, choroba Huntingtona, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane i inne rzadsze jednostki chorobowe [1]. Schorzenia te występują zarówno w postaci sporadycznej, jak i rodzinnej, co wskazuje na istnienie genetycznych czynników ryzyka, bądź mutacji sprawczych.

Intensywne badania podłoża genetycznego i molekularnych patomechanizmów wspomnianej klasy chorób doprowadziły do zidentyfikowania szeregu mutacji sprawczych, jednak w większości przypadków nie znaleziono zmian warunkujących w sposób przyczynowy fenotyp kliniczny. Choroby neurodegeneracyjne są wynikiem współwystępowania bardzo wielu genetycznych i środowiskowych czynników, a duża ich część jest wynikiem dziedziczenia wielogenowego. Zależności pomiędzy genotypem a fenotypem klinicznym są skomplikowane. Wiele mutacji sprawczych cechuje niepełna penetracja, zaś zmiany przyczynowe w tych samych genach, a nawet te same mutacje, mogą dawać różny obraz kliniczny.

Oprócz mutacji typowo sprawczych w genomie poszukuje się genetycznych wariantów wpływających w sposób statystycznie znaczący na ryzyko zachorowania, definiowanych przez różnice w rozkładzie częstości konkretnych polimorfizmów DNA w grupie pacjentów w porównaniu z osobami zdrowymi. Wspomniane warianty mogą zarówno zwiększać jak i zmniejszać ryzyko rozwoju choroby, a także modulować wiek zachorowania czy przebieg choroby. Przykładem najwcześniej i najlepiej poznanego czynnika ryzyka chorób neurodegeneracyjnych jest allel *APOEε4*. Występowanie wspomnianego allelu w postaci homozygotycznej około 10-krotnie zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę Alzheimera, podczas gdy allel *APOEε2* może stanowić czynnik ochronny (protekcyjny) [2,3]. Na pełny obraz kliniczny, oprócz czynników dziedzicznych, składają się również czynniki środowiskowe, które mogą sprzyjać bądź powodować ujawnienie się mutacji patogennej lub modyfikować jej znaczenie fenotypowe [4].

Genetyczne badania asocjacyjne pojedynczych polimorfizmów, a także metody wysokoprzepustowe np. analiza asocjacji w skali całego genomu (*Genome - Wide Association Study*, GWAS) są pomocne w identyfikacji *loci*, których zmienność wpływa na ryzyko chorób występujących powszechnie, a także w poznawaniu czynników modulujących fenotyp kliniczny. Znajomość genotypu nie wystarcza do określenia indywidualnego ryzyka zachorowania w przypadku chorób wieloczynnikowych, niemniej może wskazywać na konkretne szlaki biochemiczne i sygnałowe, zaangażowane w patomechanizm choroby. Innym wyzwaniem, przed jakim staje genetyk identyfikujący nowe warianty genetyczne, jest znajdowanie zmian sekwencji u probandów bez znajomości wywiadu rodzinnego choroby lub przy braku dostępu do DNA chorych członków rodziny. „Sporadyczność” może być zatem fałszywa, np. ze względu na późny wiek zachorowania lub brak kontaktu między członkami wielopokoleniowej rodziny. Podobnie pojęcie „rodzinności” choroby opiera się często na niepewnej i niepełnej wiedzy rodziny, która nie wsparta analizą DNA innych członków rodziny może być myląca lub mało przydatna. Ocena wpływu tego typu wariantów sekwencji jest więc często niejednoznaczna i końcowa ocena powinna być oparta na badaniach funkcjonalnych zmutowanego genu.

W większości przypadków w ocenie stopnia patogenności wariantu wykorzystuje się uzgodnione przez ekspertów standardy i protokoły interpretacji wyników. Przykładem mogą być standardy i wskazówki interpretacyjne opracowane przez American College of Medical Genetics (*ACMG Standards and Guidelines*) [5]. Umożliwiają one klasyfikowanie wariantów sekwencji DNA w sześć kategorii, zaczynając od znanych mutacji patogennych, poprzez nowe warianty o różnym prawdopodobnym wpływie, aż do nowych wariantów o nie znanej patogenności (określanych często jako "mutacja potencjalnie sprawcza" ze względu na niską częstość występowania). W ocenie stopnia patogenności mutacji wykorzystuje się m.in.:

- informacje z istniejących baz danych sekwencji (np.: Human Genome Mutation Database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk>; Database of single nucleotide polymorphisms (dbSNP) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>; czy Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://omim.org/>),
- algorytmy i programy przewidujące możliwy wpływ mutacji na produkty transkrypcji czy translacji zmutowanego genu (np.: PolyPhen <http://coot.embl.de/PolyPhen/>; SIFT <http://blocks.fhcr.org/sift/SIFT.html>;

Align GVGD http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php/; NetGene2
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>, ESE Finder
<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2>).

- analizę stopnia konserwowania w trakcie ewolucji sekwencji DNA i/lub odpowiedniego produktu białkowego (np.: *ConSeq* <http://conseq.bioinfo>, ConSurf <http://consurf.tau.ac.il>).

Analizę bioinformatyczną funkcjonalnego znaczenia wariantów sekwencji DNA wspomaga określanie kosegregacji mutacji z fenotypem choroby w rodzinie ryzyka, a także badanie grup kontrolnych (z tej samej populacji, zgodnych płcią i wiekiem z grupą badaną). Wskazane są (choć często trudne bądź praktycznie niemożliwe do przeprowadzenia) badania tkankowo-specyficznych transkryptów oraz strukturalne i funkcjonalne badania zmutowanych białek *in vitro*.

Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w biologii molekularnej i genetyce klinicznej, sprawił, że wzrosły oczekiwania dotyczące zarówno poznania zjawisk, jak i wpływu uzyskanej wiedzy na życie ludzi. Dlatego też badania biologiczne w sposób naturalny ewoluują w kierunku „medycyny translacyjnej”. Terminem tym można w skrócie określić przeniesienie wiedzy o molekularnych poziomach organizacji biologicznych na specyficzne działania pomagające pacjentom, dotyczące pojedynczych jednostek chorobowych, a dziś już może bardziej zajmujące się konkretnym pacjentem. Nowoczesna nauka wymaga na poziomie interpretacyjnym uzyskanych wyników, ale także wyznaczenia nowych kierunków badań szerokiego zakresu wiedzy z różnych dziedzin. Najczęściej i najłatwiej stan taki można osiągnąć poprzez tworzenie interdyscyplinarnych zespołów, które pomagają np. biologom w dostrzeżeniu końcowego - praktycznego celu ich badań, natomiast klinicyści pomagają zrozumieć procesy molekularne (genetyczne, epigenetyczne, biochemiczne itp.). Medycyna translacyjna dotyczy zarówno etapu diagnostyki, jak i samego leczenia. Oba działy rozwijają się w kierunku medycyny spersonalizowanej. Badania zmierzają, od szukania zmian w konkretnych genach, w kierunku poznania sekwencji całego eksomu lub genomu (*whole exome/genome sequencing*, WES/WGS) u pacjenta. Podejście takie, mające zastosowanie w diagnostyce molekularnej i farmakogenetyce, naraża jednak wielu trudności interpretacyjnych. Znaczącym ograniczeniem dla medycyny translacyjnej są nadal istniejące ograniczenia wiedzy o zależnościach pomiędzy

genotypem a fenotypem klinicznym. Zidentyfikowano ponad 3 mln wariantów genetycznych, spośród których duża część może mieć związek z ryzykiem zachorowania czy też skutecznością leczenia. W przypadku badań neurogenetycznych współpraca lekarzy, neuropsychologów i biologów pozwala poznać przynajmniej część zależności między pojedynczym genem lub konkretną mutacją tego genu a obrazem klinicznym. Techniki wysokoprzepustowe typu GWAS, WES, WGS dostarczają ogromnej ilości informacji o nowych wariantach przy jednoczesnym braku wiedzy o ich znaczeniu klinicznym. Następująca potem analiza sekwencji nukleotydowej u pacjentów ma na celu poznanie zmian w sekwencji DNA, w kolejnym kroku określenie ich ewentualnego wpływu na funkcjonalność białka, na końcu zaś wniosek, czy zmiana jest patogenna czy nieistotna dla rozwoju choroby. Jak wspomniano, określanie znaczenia fenotypowego nowych wariantów obejmuje analizę *in silico*, sprawdzenie kosegregacji zmiany w rodzinnych przypadkach, aż do badań funkcjonalnych. Badania funkcjonalne zmian, jakkolwiek w wielu przypadkach niezbędne i pozwalające określić konsekwencje mutacji, są ograniczone zarówno ze względu na ich wysokie koszty, jak i czaso- oraz pracochłonność.

Złożoność procesów neurodegeneracyjnych, jak i podobieństwo objawów klinicznych (zwłaszcza we wczesnych fazach choroby), może prowadzić do postawienia błędnej diagnozy. Prawidłowe i wczesne rozpoznanie ma jednak zasadnicze znaczenie na wszystkich etapach postępowania z pacjentem: podczas oceny czy choroba jest dziedziczna, poprzez określenie rokowania, na właściwym leczeniu kończąc. Pacjenci z otępieniem czołowo-skroniowym, mimo wciąż dopracowywanych kryteriów rozpoznania, nadal bywają diagnozowani jako zdrowi, cierpiący na zaburzenia psychiatryczne [6] lub stawiane jest im rozpoznanie choroby Alzheimera.

Z tych między innymi powodów skuteczna i szybka diagnostyka różnicowa coraz częściej bazuje na identyfikacji zmutowanych genów odpowiadających za dysfunkcje białek/szlaków metabolicznych, prowadzących do rozwoju konkretnych chorób neurodegeneracyjnych. Poznanie podłoża genetycznego nie tylko ułatwia rozpoznanie, ale przede wszystkim prowadzi do zrozumienia istotnych molekularnych mechanizmów patologii, nie tylko u pacjentów z genetycznymi czynnikami zachorowania, ale też u pacjentów bez wywiadu rodzinnego [7]. Perspektywa leczenia celowanego, przyczynowego, a także terapii genowej lub komórkowej - zapewne już

w niedalekiej przyszłości - podobnie wymagają bardzo precyzyjnego określenia genetycznego i molekularnego podłoża choroby.

Badania genetyczne w chorobach neurodegeneracyjnych mogą przyczynić się do wyjaśnienia zjawiska nakładania się objawów w różnych jednostkach chorobowych, ale także wyjaśnić dlaczego mutacje tych samych genów mogą być związane z różnymi fenotypami klinicznymi i dotyczyć różnych obszarów układu nerwowego. Na przykład do chorób pozornie różnych klinicznie, które przynajmniej w niektórych przypadkach posiadają to samo podłoże patologiczne, należy stwardnienie boczne zanikowe (*Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS*) oraz otępienie czołowo-skroniowe (*Frontotemporal Dementia, FTD*).

1.1 Otępienie czołowo-skroniowe

1.1.1 Fenotyp kliniczny

Otępienie czołowo-skroniowe należy do otępień neurodegeneracyjnych, charakteryzujących się klinicznie zaburzeniami poznawczymi i funkcjonalnymi, wynikającymi z postępującego uszkodzenia komórek nerwowych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. Względnie selektywny zanik komórek neuronalnych w płatach czołowym i skroniowych, bez większych zmian w innych regionach mózgu jest określany neuropatologicznie jako zwyrodnienie czołowo-skroniowe (*frontotemporal lobar degeneration, FTLD*). FTLD jest trzecią po chorobie Alzheimera (*Alzheimer's disease, AD*) i otępieniu z ciałami Lewy'ego przyczyną demencji. Występuje w postaci trzech zespołów klinicznych obejmujących: wariant czołowy - otępienie czołowo-skroniowe (*behavioural variant frontotemporal dementia, bvFTD*) oraz warianty skroniowe: afazję pierwotną postępującą (*primary progressive aphasia, PPA*) i otępienie semantyczne (*semantic dementia, SD*). Schematycznie schorzenia te można scharakteryzować poprzez przypisanie im zaburzeń: FTD - zachowania, PPA - językowych, SD - wiedzy pojęciowej.

Otępienie czołowo-skroniowe jest klinicznie i patologicznie bardzo zróżnicowaną grupą niealzheimerowskich demencji, a tym samym trudną do precyzyjnego zdiagnozowania. Ta grupa schorzeń definiowana jest anatomopatologicznie jako postępujący zanik płatów czołowych, skroniowych lub obu tych regionów. Natomiast pod względem klinicznym FTD charakteryzują np. zmiany osobowości, nieprzestrzeganie norm życia

społecznego, zaburzony osąd czy też zaburzenie funkcji wykonawczych, przy względnie zachowanych podstawowych funkcjach poznawczych i językowych. Zaburzenia zachowania mogą przebiegać bardzo różnie: od pobudzenia do apatii, może cechować je brak higieny osobistej, utrata wstydu bądź współczucia, hiperoralność czy zmiany upodobań żywieniowych [8]. Większość pacjentów (przynajmniej w początkowym etapie choroby) znajduje się w dobrej kondycji fizycznej. Objawy parkinsonowskie mogą rozwijać się wraz z postępem choroby, u części pacjentów (ok.15%) występują objawy towarzyszące chorobie neuronu ruchowego (MND).

Wspólne dla chorób psychicznych (schizofrenia, zaburzenie obsesyjno-kompulsywne) czy innych chorób neurodegeneracyjnych (postępujące porażenie nadjądrowe (*progressive supranuclear palsy*, PSP), zwyrodnienie korowo-podstawne (*corticobasal degeneration* CBD), ALS) objawy utrudniają jednoznaczną diagnozę FTD. Na skutek braku specyficznych biomarkerów diagnoza opiera się na kryteriach klinicznych. W 1998 r. zostały opublikowane przez Neary`ego i wsp. kryteria [9], które w wyniku postępu w poznaniu choroby uległy zasadniczej aktualizacji i ostatecznie, w roku 2011, zostały podane przez International Behavioural Variant FTD Criteria Consortium (FTDC) [10]. Porównanie diagnozy stawianej na podstawie nowoczesnych kryteriów klinicznych z pewnymi wynikami histopatologicznymi zweryfikowało czułość diagnozy klinicznej na 85%, a jej specyficzność na 95%.

Kliniczne kryteria rozpoznania FTD obejmują między innymi:

- Zaburzenia zachowania lub głęboki deficyt poznawczy w postaci wczesnych i postępujących:
 - zmian osobowości i zachowania – niewłaściwe działania i reakcje,
 - zaburzeń językowych – zaburzenia ekspresji mowy lub trudności z nazywaniem i rozumieniem słów.
- Głęboki deficyt – zaburzający funkcjonowanie społeczne i aktywność zawodową.
- Powolny początek i postępujący przebieg.
- Brak innych chorób mogących powodować powyższe zaburzenia.
- Wykluczenie chorób psychicznych.

1.1.2 Epidemiologia

Wariant behawioralny FTD dotyka nieco częściej mężczyzn niż kobiet [10,11]. Wiek zachorowania waha się między 28 a 85 rokiem życia, ze szczytem w szóstej dekadzie. Mimo że FTD uznawana jest za wczesną postać demencji, wiek zachorowania 20-25% chorych wynosi powyżej 65 lat [12]. Czas trwania choroby od pierwszych objawów wynosi średnio 6-8 lat (3 w przypadku FTD-MND). Około 40-50% pacjentów ma pozytywny wywiad rodzinny choroby.

Rozpowszechnienie choroby w populacjach jest różne i waha się od 2,7/100 000 w populacji holenderskiej (9,4/100 000 w grupie osób między 60 a 69 rokiem życia; prowincja Holandia Południowa, Holandia) [13] do 15,1/100 000 w grupie dorosłych (45 - 65 roku życia) w hrabstwie Cambridge, Wielka Brytania [14]. Obecnie wydaje się, że rozpowszechnienie na skutek nieprawidłowych diagnoz jest niedoszacowane i prawdopodobnie wynosi 15-22/100 000 [15].

1.1.3 Cechy neuropatologiczne

Pod względem neuropatologicznym bvFTD obejmuje zanik kory okołoczołowej, przedniej części zakrętu obręczy, część przednią wyspy, i płatów skroniowych [16]. Techniki neuroobrazowe zazwyczaj ujawniają zmniejszenie metabolizmu, perfuzji i zanik główniów obrębie płatów czołowych i/lub skroniowych [17]. Zmiany te mogą być symetryczne bądź asymetryczne, a zajęcie tej samej półkuli może być charakterystyczne dla danej rodziny [18]. Wspomniane zmiany związane są z selektywnym zanikiem neuronów wrzecionowatych (neurony von Economo) [19]. W obrazie mikroskopowym widoczne są zaniki neuronów piramidowych i rozplem gleju z mikrowakuolizacją w warstwie II i III kory płatów czołowych i skroniowych. Degeneracji ulega również podkorowa istota biała: wykazuje zanik aksonów, mieliny i rozplem gleju [20]. Pod względem histopatologicznym prawie wszystkie przypadki bvFTD, na podstawie akumulacji wykrywanych immunohistochemicznie nieprawidłowych złogów białkowych, można przyporządkować do trzech podgrup:

- reaktywne dla tau -FTLD- τ – akumulacja agregatów białka tau,
- ubikwityno pozytywne, tau negatywne -FTLD-TDP – akumulacja białka TDP43,

- ubikwityno pozytywne tau negatywne, ale niereaktywne dla TDP43 – FTLD-FUS- depozyty białka FUS/TLS (*fused in sarcoma / translocation in liposarcoma*)[21].
- Ubikwityno pozytywne, nie reaktywne do wcześniej wymionionych białek – FTLD-UPS (system ubikwityna-proteosom, *ubiquitin proteasome system*, UPS)

Podział na powyższe grupy pod względem histopatologicznym pozostaje aktualny, jeśli weźmiemy pod uwagę przyczynę nieprawidłowej akumulacji białka w złogach, a mianowicie mutacje w aktualnie znanych genach związane przyczynowo z FTD (Tab. 1).

Tabela 1. Podział FTD pod względem histopatologicznym

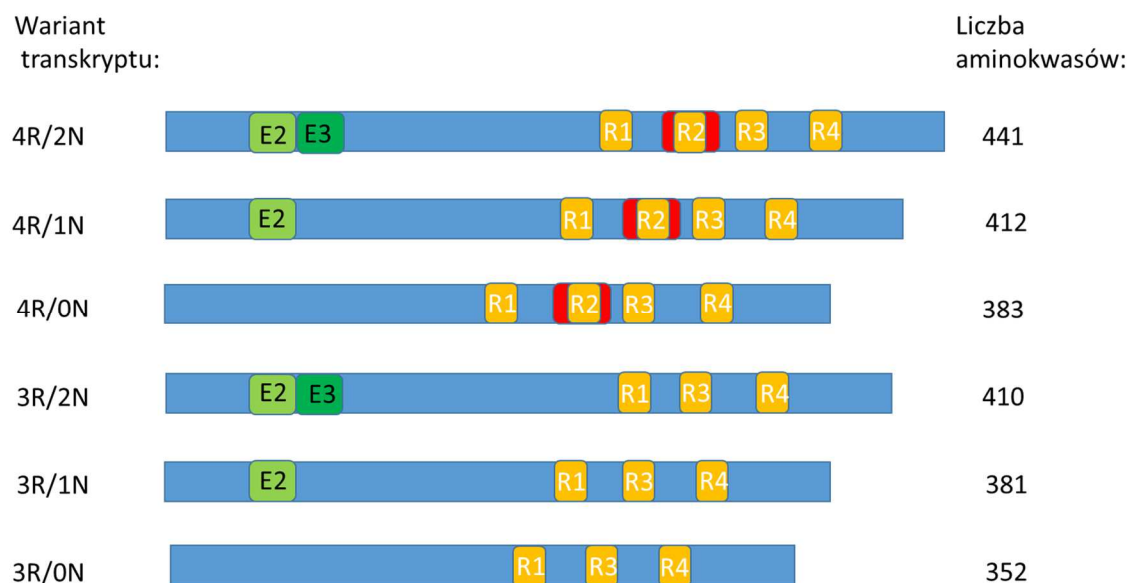
Podtyp histopatologiczny	FTLD- τ	FTLD-TDP	FTLD-FUS	FTLD-UPS
Najczęstsze przyczyny genetyczne	<i>MAPT</i>	<i>PGRN</i> <i>C9ORF72</i> <i>VCP</i>	<i>FUS</i>	<i>CHMP2B</i>
Fenotypy kliniczne	choroba Picka FTD PSP CBD	FTD CBS FTD-ALS PPA IBM*- choroba Pageta i FTD	ALS FTD BIBD* NIFID*	FTD

*IBM - wtrętowe zapalenie mięśni, NIFID - choroba z ciałami wtrętowymi neurofilamentów, BIBD - choroba wtrętów zasadowych.

1.1.4 Genetyka FTD

Wśród pacjentów cierpiących na FTD około 30-50% to osoby, które miały w swojej najbliższej rodzinie także przypadki otępienia (rodzinna postać FTD), natomiast u 10% do 40% obserwuje się autosomalny dominujący typ dziedziczenia [22], za który odpowiedzialne są mutacje w pojedynczym genie. Do chwili obecnej zidentyfikowano siedem genów (*MAPT*, *PGRN*, *VCP*, *CHMP2B*, *TARDBP*, *FUS*, *C9ORF72*), których mutacje są związane z chorobą. Mutacje trzech genów (*MAPT*, *PGRN* i *C9ORF72*) są przyczyną ponad 80% zachorowań wśród rodzinnych przypadków FTD (przyjmując, że "rodzinnosc" oznacza co najmniej trzech chorych z otępieniem (lub fenotypem MND, PSP, CBD) w dwóch pokoleniach, a co najmniej jedna ze wspomnianych osób jest w pierwszym stopniu spokrewniona z dwiema pozostałymi) [23].

Gen *MAPT* zlokalizowany jest w chromosomie 17 (17q21) i koduje białko towarzyszące mikrotubulom (*ang. microtubule associated protein tau, MAPT-tau*). Białko tau uczestniczy w polimeryzacji i stabilizacji mikrotubul, stanowi miejsce wiązania dla enzymów oraz umożliwia transport komponentów komórkowych wewnątrz komórek. Gen *MAPT* składa się z 16 eksonów, które ulegają alternatywnemu składaniu pierwotnego transkryptu (*alternative splicing*), przy czym w centralnym układzie nerwowym występują izoformy, powstające na matrycy 11 eksonów.



Ryc. 1 Schematyczna prezentacja sześciu izoform białka MAPT wykrywanych w mózgu człowieka. Pomarańczowe prostokąty (R1, R2, R3, R4) oznaczają regiony powtórzeń na końcu karboksylowym białka. Eksony 2 i 3 przedstawiono różnymi odcieniami zielonego koloru. Ekson 10 kodujący R2 zaznaczono kolorem czerwonym.

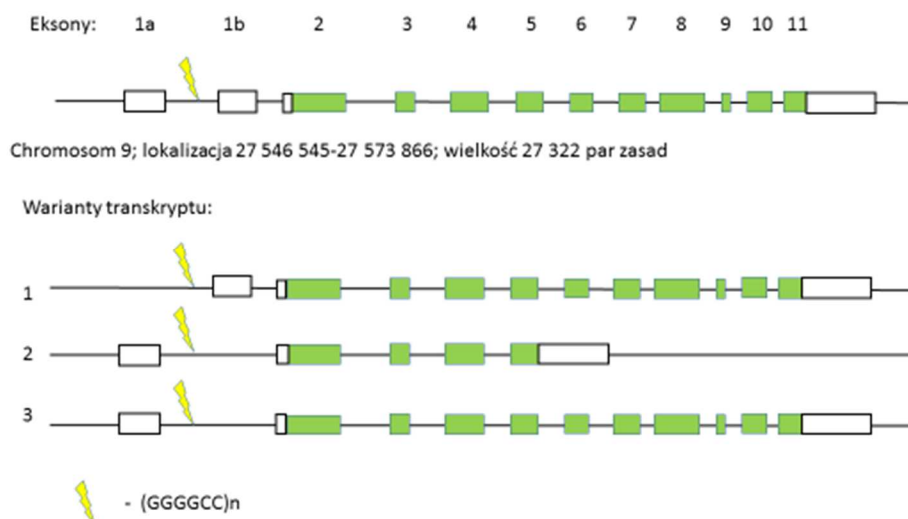
W mózgu dorosłego człowieka na skutek alternatywnego składania eksonów: 2, 3 i 10, powstaje zasadniczo sześć izoform tau (liczących 352- 441 aminokwasów, ryc. 1). Eksony 9-12 kodują C-końcówą domenę wiązania białka tau z mikrotubulami. Wspomniana domena obejmuje powtórzenia 31 lub 32 aminokwasów. Na skutek alternatywnego splicingu eksonu 10 powstaje białko z trzema (3R) lub czterema (4R) motywami wiążącymi, co ma wpływ na stabilizację mikrotubul. Izoformy z 4R stabilizują mikrotubule wydajniej. Na N-końcu białka alternatywnemu splicingowi ulegają eksony 2 i 3, dzięki czemu powstają cząsteczki zawierające 29-aminokwasowe (1N) lub 58-aminokwasowe (2N) wstawki bogate w aminokwasy kwasowe.

W mózgu mutacje genu *MAPT* wpływają na strukturę białka tau lub zmieniają proporcje różnych jego izoform, prowadząc do nieprawidłowej polimeryzacji mikrotubul, zaburzeń transportu aksonalnego oraz wywołują patologiczną agregację filamentów tau [24]. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 40 mutacji genu *MAPT* związanych z FTD (por.: Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database; <http://www.molgen.ua.ac.be> [25]). Mutacje zmiany sensu i delecje w regionach kodujących skutkują zmniejszeniem powinowactwa białka tau do mikrotubuli i hamowaniem polimeryzacji. Natomiast mutacje w sekwencjach uczestniczących w alternatywnym składaniu prowadzą do zmiany stosunku izoform 4R/3R. Patologiczne agregaty tau są identyfikowane w mózgach około 40% pacjentów z FTLD, ale mutacje znajdujące się - w zależności od populacji - u od 2 do 10% pacjentów ze sporadyczną i u 10-23% z rodzinną postacią choroby [26].

Kolejnym genem, którego mutacje są przyczyną otępieniaczołowo-skroniowego, jest gen kodujący progranulinę (*PGRN*), położony w chromosomie (17q21), oddalony o ok. 1,7 Mb od genu *MAPT* [27]. *PGRN* składa się z 13 eksonów, koduje progranulinę - sekrecyjną glikoproteinę, należącą do rodziny czynników wzrostu. Progranulina jest białkiem prekursorowym granulin, złożonym z 7,5-tandemowych powtórzeń silnie konserwowanego dwunasto-cysteinowego motywu granulin. Odgrywa ona ważną rolę m.in.: w rozwoju komórki, kontroli cyklu komórkowego, gojeniu ran czy procesach zapalnych. Udział progranuliny w procesach wiodących do neurodegeneracji jest wciąż mało poznany [28]. Pod względem histopatologicznym pacjenci z mutacjami w genie *PGRN* nie mają patologii tau, ale cytoplazmatyczne i wewnątrzjądrowe neuronalne wtręty zbudowane z ubikwityno-immunoreaktywnego białka TDP43. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad sześćdziesiąt mutacji *PGRN* (por: www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations) związanych przyczynowo z FTD i - szerzej - z FTLD. Prawie wszystkie mutacje *PGRN* powodujące FTLD są mutacjami całkowicie znoszącymi funkcję kodowanego białka, czego rezultatem jest haploinsuficjencja. Pozostałe mutacje powodują nieprawidłowe fałdowanie domeny granulin, prowadząc do niestabilności cząsteczki, jej nieprawidłowej sekrecji i degradacji [29]. Dla części mutacji udowodniono wpływ przyczynowy na rozwój choroby, a w przypadku pozostałych istnieje wiele danych wskazujących na ich patogenność.

Mutacje *PGRN* identyfikowane są w klinicznie różnych schorzeniach neurodegeneracyjnych, w tym w wariacie czołowym FTD, postępującym porażeniu nadjądrowym, zwyrodnieniu korowo-podstawnym, jak również stwardnieniu zanikowym bocznym/chorobie neuronu ruchowego, a także chorobie Alzheimera oraz w fenotypach pośrednich. Mutacje *PGRN*, powodujące haploinsuficjencję, dwukrotnie zmniejszają poziom progranuliny w surowicy. Badania na modelach mysich łączą niski poziom *PGRN* z obniżonym poziomem połączeń neuronalnych [30]. Mutacje te mogą mieć też związek z odpowiedzią immunologiczną – prowadzą do zaburzeń regulacji układu odpornościowego [28,31]. Częstość występowania mutacji *PGRN* wynosi 2-11% w przypadku pacjentów z FTD bez udokumentowanych przypadków w rodzinie i wzrasta do 6-25% wśród chorych z rodzinną FTD [32,33,34,35]. W przypadku AD częstość mutacji *PGRN* jest niewielka i sięga 1,3% [36], a u pacjentów chorych na ALS szacuje się ją na 0,7-2% [37,38].

Ekspansja sześci nukleotydowego (GGGGCC) fragmentu (w literaturze także: HRE, *hexanucleotide repeat expansion*, (GGGGCC)_n, G4C2) w intronie otwartej ramki odczytu w ramieniu krótkim chromosomu 9 (*C9ORF72*) jest związana z FTD, jak i z ALS, a u pacjentów z tą mutacją identyfikuje się również złogi ubikwitynowanego białka TDP43 w mózgu. Funkcja białka kodowanego przez *C9ORF72*, chociaż jest silnie konserwowane ewolucyjnie i ulega ekspresji w wielu tkankach, m.in. w mózdzku, korze mózgu i rdzeniu kręgowym, pozostaje nieznana [39]. Kodowane przez 12 eksonów białko prawdopodobnie posiada trzy warianty transkryptu i dwie izoformy. Badania histochemiczne wykazały również w homogenatach mózgowych osób z mutacją HRE obecność nierozpuszczalnych białek o wysokiej masie cząsteczkowej, charakteryzujących się obecnością dwuaminokwasowych powtórzeń (glicyna-prolina) będących produktem translacji sekwencji powtarzalnej [40]. Badania immunohistochemiczne dowiodły również, że białko to tworzy wtręty cytoplazmatyczne i wewnątrzjądrowe w neuronach, nie wykryto ich natomiast w astrocytach i komórkach innych tkanek obwodowych. U ludzi bez schorzeń neurologicznych liczba powtórzeń waha się między 1 a 30 (górną granicą jeszcze nie została ustalona), natomiast patogenną liczbę powtórzeń szacuje się na powyżej 50, najprawdopodobniej powyżej 400 powtórzeń.



Ryc. 2 Struktura *C9ORF72* i trzech wariantów transkryptu powstających wskutek alternatywnego składania. Białe prostokąty oznaczają eksony nie ulegające translacji, zielone – ulegające translacji. Pozycje regionu z powtórzeniami GGGGCC oznaczono strzałką. Schemat opracowano na podstawie Woollacott et al. 2014 [46].

W różnych populacjach zwiększona liczba heksanukleotydowych powtórzeń identyfikowana jest u ok. 5–17% pacjentów z FTD (21-41% z rodzinną postacią) [41]. Ta sama mutacja identyfikowana jest również u pacjentów z ALS. W różnych populacjach odpowiada za 20-50% zachorowań na rodzinną postać ALS [42,43] i 4-21% u pacjentów ze sporadyczną postacią [44,45]. Mutacje w *C9ORF72*, w porównaniu z innymi czynnikami genetycznymi, uważa się za najczęstszą przyczynę obu chorób: FTD i ALS. Odpowiadają także za 10-88% ALS-FTD [46]. Oprócz wymienionych, wspomniane mutacje identyfikowano w pojedynczych przypadkach innych schorzeń (AD, rzekome otępienie w przebiegu depresji, chorobie Parkinsona). Mutacje w *C9ORF72* mogą dawać różny efekt, nawet u członków jednej rodziny, którzy wykazują typowe FTD, FTD-ALS, ALS-FTD czy klasyczne ALS [47]. Zwiększoną liczbą powtórzeń GGGGCC zidentyfikowano także w różnych populacjach w grupie kontrolnych gdzie częstość wynosiła 0,15%-0,6% [46].

Mutacje w pozostałych genach wykrywane są bardzo rzadko. Białko TDP43 wykrywane jest jako główny składnik złogów w blisko połowie przypadków FTD i w prawie wszystkich przypadkach FTD-ALS. Jest kodowane przez gen *TARDBP* zlokalizowany w chromosomie 1 (1q36). Gen składa się z 6 eksonów, które ulegają

alternatywnemu składaniu pierwotnego transkryptu, dając 11 izoform białka. Mutacje w tym genie zostały zidentyfikowane u pojedynczych pacjentów z FTD [48].

U około 5% pacjentów z FTD badania histochemiczne nie wykazują obecności złogów białka tau ani TDP43 [49]. Za większość wspomnianych przypadków odpowiadają mutacje w genie *FUS* zlokalizowanym w ramieniu krótkim chromosomu 16 (16p11). Koduje on białko zbudowane z 526 aminokwasów. Pacjentów z mutacjami w genie *FUS* cechuje niższy wiek zachorowania (średnio ok. 41 lat). Mutacje *FUS* są odpowiedzialne na całym świecie za pojedyncze przypadki FTD, ale także za około 4% rodzinnych przypadków ALS i pojedyncze przypadki sporadycznej postaci tej choroby [50]. Patologię *FUS* zaobserwowano również w chorobie Huntingtona. Oba białka (TDP43 i *FUS*) wiążą się z DNA oraz RNA i uczestniczą w regulacji naprawy DNA, transkrypcji, czy obróbce RNA. Mutacje w tych genach są identyfikowane w pojedynczych przypadkach FTD [51].

1.2 Stwardnienie zanikowe boczne

1.2.1 Fenotyp kliniczny

Stwardnienie zanikowe boczne to choroba nerwowo-mięśniowa charakteryzująca się neurogennym zanikiem mięśni. Postać klasyczna nosi nazwę choroby Charcota. W Stanach Zjednoczonych nazywana jest także chorobą Lou Gehriga. W literaturze można spotkać również określenie „choroba neuronu ruchowego” (*motor neuron disease*, MND) dla grupy nieklasycznych postaci ALS obejmujących rzadsze postaci kliniczne, takie jak postępujące porażenie opuszkowe (*progressive bulbar palsy*, PBP), postępujący zanik mięśni (*ang. primary muscle atrophy*, PMA) i pierwotne stwardnienie boczne (*primary lateral sclerosis*, PLS). Najczęstszą postacią jest postać klasyczna i choruje na nią około 2/3 pacjentów z ALS [52]. ALS charakteryzuje się postępującym i wybiórczym uszkodzeniem neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia, pnia mózgu i kory ruchowej. Utrata neuronów prowadzi do niedowładu i zaniku mięśni poprzecznie prążkowanych.

We wczesnej fazie stwardnienia zanikowego bocznego dominują dwie postaci: kończynowa (*limb onset*), stanowiąca 75% i postać opuszkowa (*bulbar onset*) - 25% zachorowań. Niedowładom kończyn/mięśni twarzy i gardła w badaniu

neurologicznym towarzyszy zanik mięśni, fascykulacje i fibrylacje, wzrost napięcia mięśniowego, wygórowanie odruchów i objawy patologiczne, np. Babińskiego. W późniejszym okresie dochodzi do porażenia cztero kończynowego, anartrii, afagii, a ostatecznie niewydolności oddechowej wymagającej wentylacji mechanicznej. U około 10% pacjentów stwierdza się objawy otępienia czołowo-skroniowego.

Mimo badań, które wykazały obecność wielu zaburzeń w funkcjonowaniu neuronów ruchowych (np.: ekscytotoksyczności, zaburzenia w produkcji energii, metabolizmie wapnia, nieprawidłowego fałdowania białek, zaburzeń transportu aksonalnego) w ALS i podejrzeniu wpływu różnych czynników środowiskowych (stres oksydacyjny, infekcje wirusowe, toksyny, zaburzenia mitochondrialne czy apoptoza) przyczyna ich obumierania nadal jest nieznana [53]. Wydaje się, że przyczyną choroby są w różnym stopniu czynniki środowiskowe i genetyczne.

1.2.2 Cechy neuropatologiczne

Badania pośmiertne osób z ALS uwidaczniają przede wszystkim rozległy zanik mięśni. Pod względem neuropatologicznym ALS obejmuje zmiany zwyrodnieniowe i ubytek neuronów w korze ruchowej, jądrach ruchowych nerwów czaszkowych i neuronach rogów przednich rdzenia kręgowego. Ubytek w korze mózgowej dotyczy komórek piramidowych warstwy III i V oraz komórek Betza. Komórki wykazują tigrilizę, obkurczenie nadmierną barwliwość, nagromadzenie lipofuscyny [54]. W wielu przypadkach w cytoplazmie komórek ruchowych stwierdzono obecność różnego rodzaju wtrętów (ciał Buniny, wtrętów mielinowych i wtrętów zasadochłonnych). Składnikiem cytozolem ubikwitynowanych wtrętów jest białko TDP43 (opisane w poprzednim rozdziale), które w warunkach prawidłowych zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym. W obrębie pnia mózgu największy zanik i ubytek występują w jądrze nerwu XII oraz jądrze dwuznacznym, w obrębie rdzenia kręgowego w zgrubieniu szyjnym i lędźwiowym. W obwodowym układzie nerwowym zwyrodnienie aksonalne ruchowych włókien nerwowych prowadzi do zaniku komórek mięśni szkieletowych oraz mięśnia przepony.

1.2.3 Epidemiologia

Choroba najczęściej dotyka ludzi w szóstej dekadzie życia (szczyt zachorowań 58-63 lata), choć ok. 10% pacjentów choruje przed 40 rokiem życia. Śmierć następuje

po 3-5 latach od pojawienia się pierwszych objawów, najczęściej w mechanizmie niewydolności oddechowej. Zapadalność wynosi 1-2.5:100 000, a chorobowość 4-8:100 000 [55]. Ponad 90% przypadków ALS ma charakter sporadyczny, a etiologia pozostaje nieznana. W tej grupie dostrzega się przewagę zachorowalności mężczyzn nad kobietami (1,5:1). W 5-10% choroba występuje rodzinie (FALS), najczęściej z autosomalnym dominującym sposobem dziedziczenia. W tej grupie pacjentów szczyt zachorowań to 47-52 rok życia, nie dostrzega się jednak przewagi zachorowań mężczyzn.

Rozpoznanie ALS odbywa się na podstawie zmodyfikowanych w 2008 roku kryteriów El Escorial, ustalonych przez World Federation of Neurology [56]. Oporają się one na identyfikacji klinicznej zajęcia górnego i dolnego neuronu ruchowego. Zajęcie dolnego neuronu ruchowego potwierdza się badaniem elektromiograficznym (EMG). Ocena zajęcia górnego neuronu ruchowego jest przede wszystkim kliniczna, wspierana w ostatnim czasie technikami obrazowymi (rezonans magnetyczny, spektroskopia rezonansu magnetycznego) czy elektrofizjologicznymi (stymulacja magnetyczna). Cechy uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego obecne razem w dwóch z czterech regionów OUN (pniu mózgu, odcinku szyjnym, piersiowym czy lędźwiowym) pozwalają postawić diagnozę klinicznie prawdopodobnego, a w trzech z czterech – klinicznie pewnego ALS. Mimo stosowania tych kryteriów u 5-10% pacjentów z początkowym podejrzeniem ALS ostateczna diagnoza jest inna. Brak wiedzy na temat patomechanizmu choroby, a w szczególności brak jednoznacznych biomarkerów powoduje, iż postawienie prawidłowej diagnozy, zwłaszcza w początkowym stadium, jest trudne. Dzięki rozwojowi diagnostyki molekularnej w niektórych przypadkach można potwierdzić genetyczne tło choroby. Spośród ponad 20 genów (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>) związanych głównie z rodzinną postacią ALS, najczęściej identyfikuje się mutacje w czterech: *C9ORF72* (ok. 34% rodzinnych postaci choroby), *SOD1* (ok. 20%), *TARDBP* (2-6%), *FUS* (4-8%) [57]. Są one również przyczyną około 10% postaci sporadycznej choroby. U pacjentów z ALS rzadko identyfikowano mutacje sprawcze w innych genach, o odmiennym mechanizmie patogennym, powodującym: wiązanie produktów białkowych z RNA oraz nieprawidłową obróbkę białek (*ANG*, *SEXT*, *TAF15*, *EWSR1*), ekspansję nukleotydową (*ATXN2*), proteostazę (ang. proteostasis) białek (*OPTN*, *UBQLN2*, *SQSTM1*, *VCP*, *CHMB2P*, *FIG4*), ekscytotoksyczność (*DAO*), zaburzenia

budowy cytoszkieletu lub transportu komórkowego (*VAPB*, *PRPH*, *DCTNI*, *NFH*, *PFNI*) czy o niejasnym patomechanizmie (*ALS2*, *SPG11*) [58].

W różnych populacjach od 10 do 20% rodzinnych (ok. 2% sporadycznych) przypadków spowodowanych jest mutacjami punktowymi w genie dla cytozolowej miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD1*) [59]. Gen zbudowany jest z 5 eksonów kodujących 153-aminokwasowe białko. Dysmutaza ponadtlenkowa 1 jest białkiem silnie konserwowanym ewolucyjnie, występującym w cytozolu, jądrze komórkowym, peroksysomach, przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach ludzkich. *SOD1* zawiera cynk i miedź, występującym w organizmie w postaci homodimeru o masie 32 kDa. Główną funkcją *SOD1* jest usuwanie wolnych rodników. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 150 mutacji zlokalizowanych we wszystkich eksonach *SOD1*, jednak patogenność udowodniono nie dla wszystkich mutacji. Większość to mutacje zmiany sensu, kilkanaście to mutacje skracające białko (terminacyjne). Część mutacji redukuje aktywność białka, natomiast pozostałe nie zmieniają aktywności katalitycznej enzymu. Wiek zachorowania i postęp choroby zależy często od konkretnej mutacji, jednak nie stwierdzono wyraźnego związku między zmianami w aktywności enzymu, a konkretnymi mutacjami.

Istnieją dwie hipotezy dotyczące wpływu zmutowanego białka na rozwój ALS. Pierwsza z nich opiera się na założeniu, że mutacje *SOD1* powodują zmianę aktywności enzymatycznej poprzez wpływ na katalizę miedzi lub nieprawidłowe wiązanie metali. Druga, obecnie uważana za bardziej prawdopodobną (oparta na badaniach eksperymentalnych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych) wskazuje na uzyskanie cechy toksyczności (*toxic gain of function*) przez zmutowane białko o niestabilnej konformacji [60].

Najkrótszym czasem przeżycia od momentu zachorowania charakteryzują się pacjenci z mutacją A4V. Mutacja D90A jest powszechna w Skandynawii – 2-3% społeczeństwa jest heterozygotycznym nosicielem bez objawów choroby, a w postaci homozygotycznej wykazuje powolny postęp ALS (czas przeżycia ok. 10 lat). Natomiast pacjenci z heterozygotyczną mutacją z innych regionów świata, nie mający skandynawskich przodków, rozwijają klasyczną postać ALS z czasem przeżycia 3-5 lat.

1.3 FTD-ALS

Cechy wspólne lub pokrywające się obu chorób (stwardnienia zanikowego bocznego i otępienia czołowo-skroniowego) z zakresu objawów klinicznych, neuropatologii czy tła genetycznego skłoniły klinicystów oraz naukowców do podjęcia prób ich połączenia w jedną jednostkę chorobową o szerokim spektrum. Obejmowałaby ona „czysty ALS”, formy pośrednie (ALS-FTD, FTD-ALS o różnym stopniu), do „czystego FTD”. W rzadkich przypadkach stwardnienie zanikowe boczne współistnieje z FTD (FTD/ALS). Około 20% chorych z FTD ma również objawy choroby neuronu ruchowego. Natomiast u chorych z ALS nierzadko stwierdza się zaburzenia poznawcze o różnym stopniu nasilenia, od dyskretnych zaburzeń funkcji wykonawczych wykrywalnych u 20-40% pacjentów, aż do klinicznego otępienia czołowo-skroniowego (FTD) [61]. Zaburzenia poznawcze mogą poprzedzać lub następować po ujawnieniu się objawów uszkodzenia neuronu ruchowego. Połączenie tych dwóch zespołów może występować w postaci zarówno sporadycznej, jak i rodzinnej. Oprócz nakładających się cech klinicznych istnieją także wspólne cechy obserwowane na poziomie neuropatologicznym. Głównym czynnikiem łączącym obie choroby są złogi białka TDP-43 [62] i FUS [63], występujące we wtrętach neuronalnych. U pacjentów z FTD złogi białka TDP43 znajdują się w korze mózgu, u pacjentów ALS w rdzeniu kręgowym, natomiast u pacjentów z FTD-ALS w obu lokalizacjach [64]. Kolejnym połączeniem obu schorzeń jest wspólne tło genetyczne. Opisano liczne rodziny z FTD/ALS o dziedziczeniu autosomalnie dominującym, prezentujące patologię TDP-43 [65]. Ich główną przyczyną jest ekspansja omówionych wyżej heksanukleotydowych powtórzeń w *C9ORF72*, będąca głównym wspólnym genetycznym czynnikiem obu schorzeń, a także ALS/FTD. U ponad 30% pacjentów z ALS z wspomnianą mutacją charakterystyczną cechą jest współistnienie FTD i częste występowanie FTD w rodzinach. Także mutacje w innych genach związanych z patologią TDP43 występują u pacjentów z ALS i FTD. Mutacje w genie *TARDBP* kodującym białko TDP43 są identyfikowane głównie u pacjentów z ALS lub ALS-FTD, ale także u pojedynczych osób z FTD bez objawów uszkodzenia neuronu ruchowego [66]. Natomiast mutacje w *PGRN* są dużo częstsze u pacjentów z FTD, ale także identyfikowane u pojedynczych pacjentów z ALS. Wydaje się natomiast, że nie ma połączenia między mutacjami w genie *SOD1* będącymi częstą

przyczyną ALS a otępieniem, analogicznie nie zidentyfikowano mutacji w *MAPT* u pacjentów z ALS.

Obecnie przyjmuje się, że ALS i FTD są chorobami o nakładających się cechach klinicznych, patologicznych, ale także o wspólnych przyczynach genetycznych. Sugeruje to, że mogą mieć wspólny neurodegeneracyjny patomechanizm, a co za tym idzie, mogą być częścią jednej choroby o szerokim spektrum objawów.

Mimo że zmiany poznawcze i behawioralne są uważane za część składową fenotypu ALS, to pod względem klinicznym pacjenci z ALS (zwłaszcza z niedużym deficytem poznawczym) pozostają nie zdiagnozowani pod tym kątem. Jedynie pacjenci, z oczywistymi oznakami demencji, we wczesnej fazie choroby są diagnozowani neuropsychologicznie. Standardowe testy pomagające w diagnozie otępień często nie są odpowiednie do badania stanu pacjenta z ALS [67].

2 CEL PRACY

- 1) Określenie podłoża genetycznego (zwłaszcza mutacji sprawczych) u chorych z rozpoznaniem ALS, FTD i z fenotypami pokrewnymi.
- 2) Oszacowanie częstości występowania mutacji związanych przyczynowo z ALS, FTD i fenotypami pokrewnymi w populacji polskiej.
- 3) Określenie możliwych korelacji między rodzajem mutacji a fenotypem klinicznym.
- 4) Ocena znaczenia fenotypowego wariantów sekwencji DNA zidentyfikowanych po raz pierwszy w badanych grupach.

3 PACJENCI, MATERIAŁY I METODY

3.1 Badane grupy chorych

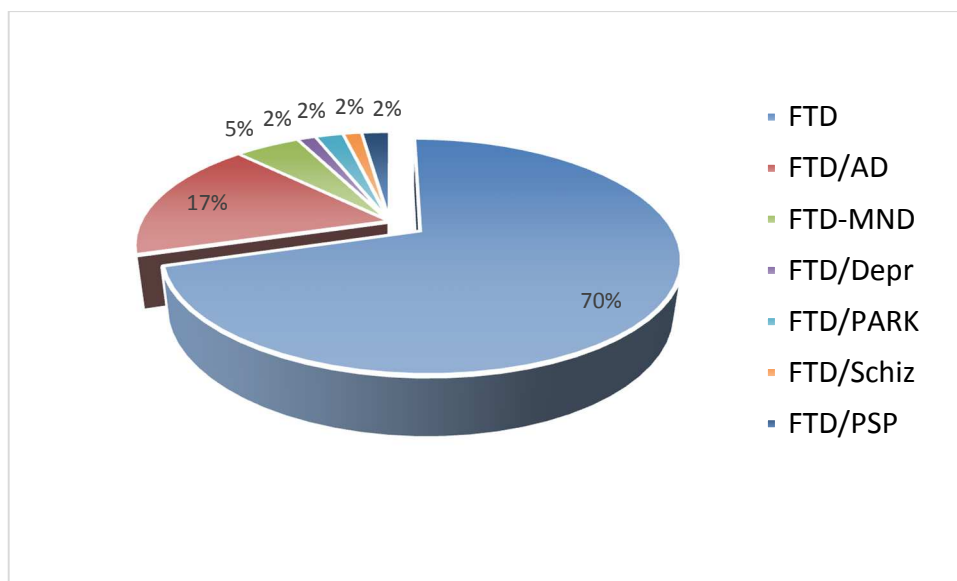
3.1.1 Pacjenci z fenotypem FTD

Badania prowadzono w grupie chorych z prawdopodobnym rozpoznaniem otępienia czołowo-skroniowego. Chorzy zostali zakwalifikowani do badań w Klinice Neurologii Szpitala MSW w Warszawie i Oddziału Neurologii Szpitala Specjalistycznego św. Wojciecha w Gdańsku. Diagnoza FTD była stawiana zgodnie z kryteriami Lund – Manchester (Lund and Manchester Groups). W badaniu wykorzystano DNA od 138 niespokrewnionych ze sobą osób z prawdopodobnym rozpoznaniem otępienia czołowo-skroniowego (grupa dalej zwana FTD) i składała się z pacjentów z ostatecznym rozpoznaniem: FTD (97* osób, dalej określana - F1), FTD-MND (7), FTD z parkinsonizmem (3) oraz 31 pacjentów z podejrzeniem FTD: FTD/AD (24 osoby), FTD/PSP(3), FTD/Schizofrenia (2), FTD/depresja (2). Średni wiek zachorowania wynosił $56,3 \pm 11,8$ lat. Kobiety stanowiły 45%, mężczyźni 55%. W tabeli 2 przedstawiono ogólną charakterystykę grupy FTD. Wiek wystąpienia pierwszych objawów uznano za umowny wiek zachorowania.

* Grupa liczyła początkowo 97 osób z ostatecznym rozpoznaniem FTD, + 2 kolejne osoby z rozpoznaniem niepewnym (FTD/AD) ze zidentyfikowanymi mutacjami, które w trakcie procesu oceny klinicznej zdiagnozowano ostatecznie jako osoby z FTD

Tabela 2. Charakterystyka grupy FTD.

	n	Średni wiek zachorowania (lata)	Odchylenie standardowe (lata)	Kobiety/ Mężczyźni	Wywiad rodzinny dodatni
FTD	138	56,3	11,77	62/76	57
F1	97	57,7	11,92	44/53	40
FTD/AD	24	54,4	10,65	12/12	12
FTD-MND	7	57,8	10,51	2/5	1
FTD/depresja	2	53,5	9,5	1/1	1
FTD z parkinsonizmem	3	51,7	3,85	0/3	1
FTD/Schizofrenia	2	51,5	25,5	2/0	1
FTD/PSP	3	55,3	2,36	½	0



Ryc. 3 Procentowy udział pacjentów z poszczególnym rozpoznaniem w badanej grupie pacjentów (FTD)

3.1.2 Pacjenci z fenotypem ALS

Badania przeprowadzono w grupie chorych z rozpoznaniem stwardnieniem bocznym zanikowym. Chorych kwalifikowano do badań w Klinice Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Diagnoza ALS stawiana była zgodnie z kryteriami El Escorial, wszyscy chorzy włączeni do badania wyrazili świadomą zgodę. Grupa ALS obejmowała 396

niespokrewnionych ze sobą pacjentów. Średni wiek zachorowania wynosił 54,8 lat. Kobiety stanowiły 42%. U 89 pacjentów z tej grupy (obejmującej przypadki rodzinne i osoby o wczesnym wieku zachorowania, średnia wieku zachorowania 45,6 lat, 17 przypadków rodzinnych) dokonano analizy sekwencji kodującej genu *SOD1*.

3.1.3 Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 257 zdrowych osób. Wśród nich 101 przebadanych neurologicznie osób powyżej 65 roku życia (średni wiek $70,9 \pm 5,2$ lat; 24% mężczyzn i 76% kobiet) oraz 156 osób (średni wiek $24,1 \pm 2,9$ lat; 49% mężczyzn i 51% kobiet) (grupa K1), nie skarżących się na żadne dolegliwości zdrowotne (grupa K2).

Deklaracja etyczna

Od wszystkich osób chorych (bądź ich prawnych opiekunów), a także od osób zdrowych z grupy kontrolnej, uzyskano pisemną zgodę na badania, zgodnie z deklaracją helsińską (BMJ 1991; 302:1194). Komisja Etyki i Nadzoru nad Badaniami na Ludziach i Zwierzętach Centralnego Szpitala Klinicznego MSW wyraziła zgodę (nr 31/2013) na przeprowadzenie przedstawionych poniżej badań.

3.2 Zastosowane techniki

Numery sekwencji referencyjnych badanych genów, które były wykorzystane podczas badań przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Numery sekwencji referencyjnych.

	PGRN	MAPT	SOD1
Sekwencja nukleotydowa genu	NG_007886.1	NG_007398.1	NG_008689.1
Sekwencja cDNA	NM_002087.2	BN000503.1	NM_000454.4
Sekwencja aminokwasowa	NP_002078.1	CAG26750.1	NP_000445

3.2.1 Izolacja DNA oraz RNA

Analizę sekwencji nukleotydowej prowadzono z wykorzystaniem genomowego DNA wyizolowanego z leukocytów krwi obwodowej, z zastosowaniem metody stopniowego wysalania białek komórkowych (6M NaCl) wg Millera i wsp. (1988) [68]. Otrzymany DNA zawieszano w 96% alkoholu etylowym, a następnie w H₂O i przechowywano w temperaturze -20°C. Część DNA rozcieńczano do stężenia roboczego 20 ng/μl. Leukocyty pacjentów, u których izolowano RNA przed etapem izolacji RNA, zawieszano w RNALater (Ambion) i przechowywano w 4°C, a następnie w -20°C. Dalsze etapy izolacji RNA przebiegały zgodnie z protokołem TRI Reagent Solution (Ambion). RNA zawieszano w 30-100 μl H₂O i przechowywano w -70°C.

3.2.2 Analiza spektrofotometryczna DNA i RNA

Ilość i czystość wyizolowanego DNA i RNA określano spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Dodatkowo w przypadku RNA jakość preparatów potwierdzano metodą elektroforetyczną.

3.2.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcje łańcuchowe polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) prowadzono w termocyklerach *DNA Engine (BIO-RAD)* oraz Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler. PCR (oprócz opisanych poniżej) prowadzono w końcowej objętości 10 μl z wykorzystaniem zestawu Taq PCR Core Kit (Qiagen). Każdorazowo stosowano kontrolę negatywną (mieszanina reakcyjna bez DNA).

Startery zaprojektowano na podstawie sekwencji zebranych w GeneBank, z wykorzystaniem programu Primer 3 Input (wersja 0.4.0) [69] tak, aby sekwencje były komplementarne do sekwencji flankujących analizowany region.

3.2.3.1 Amplifikacja genu *PGRN*

Seqwencję starterów zaczerpnięto z artykułu Bakera i wsp. (2006) [32] (Tab. S 1 [SUPPLEMENT]). Warunki amplifikacji zostały zmienione. Ponieważ eksony *PGRN* rozdzielone są stosunkowo krótkimi sekwencjami intronowymi, zdecydowano przeprowadzić reakcję PCR w taki sposób, by jeden amplikon obejmował cztery eksony

(wraz z sekwencjami intronowymi) (stosowano startery 1F-45R, 45F-8R i 8F-12R). W rezultacie trzy zachodzące na siebie amplikony pokrywały całą sekwencję genu (eksony 1-12). W porównaniu z pracą Bakera i wsp. (2006) [32], ze względu na powstawanie dłuższych produktów, wydłużono czas elongacji (w pierwszych piętnastu cyklach: 1min sec i w kolejnych dwudziestu cyklach - 1:30). Zastosowano technikę *touchdown PCR* (temperatura przyłączania starterów w cyklach 1 i 16 wynosiła 58°C, w kolejnych zaś spadała o 0,1°C na cykl (Tab. S 2).

3.2.3.2 Amplifikacja genu *MAPT*

Warunki amplifikacji (Tab S 3) i sekwencje starterów (Tab. S 4) zaczerpnięto z artykułu Żekanowskiego i wsp. (2003) [70].

3.2.3.3 Amplifikacja genu *SOD1*

Amplifikację eksonów 1-5 wraz z sekwencjami intronowymi prowadzono z użyciem starterów (patrz Tab. S 5) zaprojektowanych z wykorzystaniem programu Primer3 oraz sekwencji referencyjnej NG_008689.1. Warunki reakcji przedstawiono w Tab. S 6.

3.2.4 Rozdział elektroforetyczny

W celu określenia wielkości uzyskanych fragmentów DNA prowadzono elektroforezę DNA w 0,5-2% żelach agarozowych, zawierających bromek etydyny (o końcowym stężeniu 0,5 µg/ml) oraz bufor 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) [71]. Jako marker DNA stosowano 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 90-130 V, a następnie żele wizualizowano w świetle UV o długości fali $\lambda = 312$ nm.

3.2.5 Oczyszczanie produktów PCR

Produkty PCR, przed bezpośrednim sekwencjonowaniem fluorescencyjnym, oczyszczano stosując ExoSAP (USB) lub mieszaninę Exonuclease I i FastAP (Fermentas) zgodnie z zaleceniami producenta.

3.2.6 Bezpośrednie sekwencjonowanie fluorescencyjne

Do bezpośredniego sekwencjonowania fluorescencyjnego stosowano zestawy ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 lub v3.1 (Applied Biosystem). Matrycę do reakcji stanowiły oczyszczone produkty PCR, rozcieńczane w zależności od wydajności PCR 10-20x wodą dejonizowaną. Reakcje sekwencjonowania prowadzono w końcowej objętości 10µl, w warunkach zgodnych z zaleceniami producenta. Do PCR sekwencyjnego używano jednego ze starterów stosowanych do powielania konkretnego eksonu.

Produkty reakcji sekwencjonowania oczyszczano przez wytrącanie (EtOH 95%, 3M NaOAc pH 4,6), zliofilizowano, dodawano dejonizowany formamid (10-20µl Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) i przed elektroforezą denaturowano w temperaturze 95°C. Następnie produkty reakcji sekwencjonowania rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej w analizatorze kwasów nukleinowych ABI Prism Genetic Analyzer 310 lub 3130 (Applied Biosystems). Analizę wyników sekwencjonowania prowadzono z wykorzystaniem programów DNA Sequencing Analysis Software v5.1 (Applied Biosystems) oraz Sequencher Software v4.7 (Gene Codes).

W przypadku zidentyfikowania zmian sekwencji, powtarzano procedurę powielania konkretnego fragmentu genu oraz sekwencjonowanie stosując nową porcję wyjściowego genomowego DNA.

3.2.7 Analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych

Obecność wymienionych poniżej mutacji sprawdzano w grupie kontrolnej (n=200), metodą określania polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP), przecinając produkty PCR enzymem restrykcyjnym, specyficznym do zmutowanej (bądź prawidłowej) sekwencji. Wykorzystano następujące enzymy restrykcyjne: *AvaI* (Fermentas); mutacja *PGRN* P439_R440fsX6 – enzym *AvaI* (Fermentas); *SOD1* D90A – *BbvI* (Fermentas). Reakcje prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta, a wynik sprawdzano elektroforetycznie.

3.2.8 Analiza haplotypu *MAPT*

Analizę haplotypu *MAPT* przeprowadzono u pacjentki z mutacją G55R oraz jej 4 dorosłych synów. Haplotyp określono sprawdzając obecności – lub jej brak - 238

zasadowej delecji pomiędzy eksonami 9 i 10, a następnie przypisano do konkretnych podhaplogrup analizując obecność pięciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (rs2471738, rs1467967, rs7521, rs242557, rs3785883), położonych z obu stron mutacji. Startery (Tab. S 7), warunki reakcji oraz podział na haplotypy H1/H2 i podhaplotypy zaczerpnięto z artykułu Bakera i wsp. (1999) [32]. Do określenia haplotypu niezbędne okazało się sprawdzenie pokrewieństwa pomiędzy braćmi (dwóch nosicieli mutacji i dwóch nie posiadających mutacji). Analizę przeprowadzono stosując zestaw do identyfikacji osobniczej AmpFLSTR Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniami producenta.

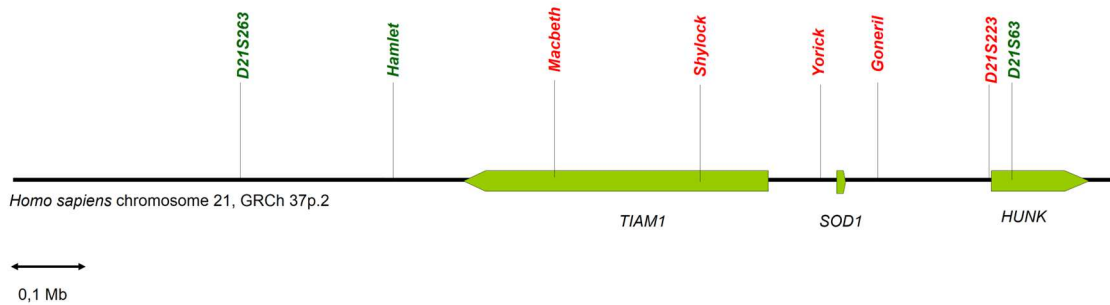
3.2.9 Określenie genotypu otwartej ramki odczytu *C9ORF72*

Genotypowanie *C9ORF72* prowadzono zgodnie z metodą opracowaną przez DeJesus-Hernandez i wsp. (2011) [45]. W pierwszym etapie próbki genotypowano z wykorzystaniem starterów znakowanych fluorescencyjnie (Tab. S 8), rozdzielając powstające produkty w analizatorze ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems); wynik analizowano stosując program Gene Mapper (Applied Biosystems). Następnie próbki, w których uzyskano jeden pik (oznaczający dwie możliwości: albo układ homozygotyczny, albo drugi allel za duży do amplifikacji) powielano metodą *repeated-primer PCR*. Wynik analizowano stosując program Gene Mapper. Próbkę, w której uzyskano wynik w postaci charakterystycznego “grzebienia”, oznaczającego więcej niż 50 powtórzeń (ryc. 13) uznawano za próbki z mutacją sprawczą. W każdej partii analiz jako kontrolę pozytywną stosowano reakcję z DNA pacjenta ze zidentyfikowaną mutacją.

3.2.10 Genotypowanie *locus SOD1*

Osiem sekwencji mikrosatelitarnych (D21S263, Hamlet, Macbeth, Shylock, Yorick, Goneril, D21S223 i D21S63) otaczających gen *SOD1* amplifikowano z użyciem starterów, z których jeden z każdej pary był znakowany fluorescencyjnie (Tab. S 9) i poddawano elektroforezie kapilarnej w ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Wynik analizowano stosując program Gene Mapper (Applied Biosystems). Warunki i startery do genotypowania zaczerpnięto z pracy Partona i wsp. (2002) [72]. Ze względu na różnice w wynikach genotypowania, wynikające z użycia do rozdziału różnych analizatorów, rezultaty uzyskane w przebadanych grupach

- polskiej i włoskiej - normalizowano, określając najbardziej prawdopodobną długość uzyskanych fragmentów DNA. Dokonano ponownej analizy genotypu 5 pacjentów z rodzin włoskich razem z członkami rodziny polskiej i uzyskane wyniki przeliczono, stosując jako odniesienie wartości podane w pracy Battistini i wsp (2010) [73].



Ryc. 4 Rozmieszczenie analizowanych polimorfizmów w otoczeniu genu *SOD1*.

3.2.11 Genotypowanie z zastosowaniem analizy dyskryminacji alleli (sondy TaqMan)

Analizę dyskryminacji alleli z zastosowaniem sond TaqMan wykorzystano do genotypowania dwóch polimorfizmów w genie *PGRN* (rs850713 i rs5848). W reakcji zastosowano handlowe zestawy TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems) (Tab. S.10). Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli dla 2 polimorfizmów mtDNA przedstawiono w Tab. S 11. Reakcję prowadzono w aparacie StepOnePlus (Applied Biosystems) w następujących warunkach:: 30 sekund w 60°C, 10 min w 95°C, 40 cykli (95°C przez 15 sekund i 60°C przez 1 minutę), 30 sekund w 60°C. Uzyskane dane analizowano wykorzystując oprogramowanie StepOne Software v2.2 (Applied Biosystems).

3.2.12 Analiza ekspresji mRNA *PGRN* w leukocytach krwi obwodowej

Z 1µg całkowitego RNA syntetyzowano cDNA z wykorzystaniem zestawu SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) i starterów oligo(dT). Następnie, w celu usunięcia RNA, dodawano 1 µl RNase H (Invitrogen) i ogrzewano w 37°C przez 20 min. Reakcję kontrolną prowadzono w mieszaninie bez starterów oligo(dT). Jakość uzyskanego produktu oceniano poprzez PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) i zaprojektowane do eksperymentów startery.

Do określenia poziomu ekspresji mRNA genu *PGRN* u pacjenta z mutacją P439 R440fsX6 zastosowano metodę porównawczą $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [74] (obliczenia względnej różnicy poziomu ekspresji badanego genu między osobą niosącą mutację, a grupą kontrolną). Analizę prowadzono w aparacie ABI 7500 (Applied Biosystems), jako fluorochrom wykorzystano SYBR Green (Applied Biosystems). Z matrycy cDNA i 4 kontroli amplifikowano fragment *PGRN* (startery: delCAF-ATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAA i delCAR -TCACCTCCATGTCACATTTTAC) i fragment *ACTB* (startery: actbF-CCGCAAAGACCTGTACGCCA i actbR-TGGACTTGGGAGAGGACTGG) jako genu referencyjnego, wedle którego normalizowano poziom ekspresji badanego genu.

Brak zmutowanej kopii mRNA genu *PGRN* potwierdzono używając PCR ze specyficznym dla zmutowanego regionu starterem R (startery: mutF-GTCTGCTGCTCGGACCAC i mutR-GTCACAGCCGATGTCTCG) i matrycą w postaci cDNA pacjenta z mutacją. Jako kontrolę pozytywną reakcji stosowano genomowy DNA tego samego pacjenta.

3.2.13 Analiza statystyczna

Do analizy częstości występowania alleli i genotypów stosowano test χ^2 oraz dwustronny dokładny test Fishera. Analizę różnic liczby powtórzeń C9ORF72 będących w zakresie niepatologicznym (<25) przeprowadzono testem U Manna-Whitnya. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p < 0,05$.

Test równowagi Hardy'ego-Weinberga i-analiza haplotypów tworzonych przez warianty genów *PGRN* i *MAPT* wykonana została programem Haploview v4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) [75]. Nierównowagę sprzężeń (*linkage disequilibrium*, LD) pomiędzy parami alleli polimorfizmów, wyrażona współczynnikiem D' (tzw. znormalizowany współczynnik nierównowagi, znormalizowana wartość delta), który został wyliczony z zastosowaniem wspomnianego programu.

3.2.14 Zastosowane programy do analizy *in silico* nowych wariantów w sekwencji DNA

Do oszacowania stopnia konserwatywności ewolucyjnej białek zastosowano program *ConSeq* (<http://conseq.bioinfo>), *ConSurf* (<http://consurf.tau.ac.il>).

Do porównania ze sobą sekwencji używano programów BLAST Assembled RefSeq Genomes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oraz Clustal X (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>).

Do analizy prawdopodobnego wpływu mutacji niesynonimicznej na funkcje białka używano programu SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Do analizy wpływu mutacji na składanie pre-mRNA (splicing) zastosowano Human Splicing Finder v2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>) [76] i ESEfinder release 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>).

Do konstrukcji i analizy haplotypów wykorzystano program Haploview 4.1 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

3.2.15 Modelowanie zmutowanej struktury białka SOD1

Analizę struktury zmutowanego białka SOD1 oraz określenie potencjalnego wpływu mutacji na własności tego białka wykonano w Pracowni Komputerowego modelowania cząsteczek chemicznych Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, dzięki uprzejmości prof. dr hab. Sławomira Filipka. Punktem wyjścia do modelowania była struktura dimeru ludzkiego białka SOD1, oznaczona kodem 2C9V w bazie Protein Data Bank (PDB). Określenie wpływu mutacji dokonano stosując program Yasara [ver. 14.2, YASARA Biosciences GmbH] wykonując symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej w polu siłowym YAMBER3 [77]. Symulacje miały na celu dopasowanie zmutowanej reszty i najbliższego otoczenia do siebie, dlatego długość tych symulacji wynosiła maksymalnie 1 ns. Reszty znajdujące się w dalszej odległości (powyżej 1 nm od zmutowanej reszty) były zamrożone, tj. nie zmieniały swojego położenia, ale oddziaływały na otaczające aminokwasy. Zamrożenie większości reszt w białku miało na celu niedopuszczenie do rozwijania się (unfolding) tego białka, gdyż symulacje były przeprowadzane w próżni.

WYNIKI

4.1 Ołępienie czołowo-skroniowe (FTD)

W badanej grupie pacjentów z prawdopodobnym rozpoznaniem FTD (n=138) zidentyfikowano 15 mutacji: 6 w *MAPT*, 4 w *PGRN* i 5 w *C9ORF72* (Tab. 3). Odpowiedzialne są one za około 11% przypadków zachorowań w grupie FTD (Ryc.5), natomiast u pacjentów z klinicznym pewnym rozpoznaniem FTD - 15% (n=99[†]) (Ryc. 6). Zidentyfikowano jedną mutacj *C9ORF72* u pacjenta ze sporadyczną postacią FTD-MND. Mutacje we wspomnianych genach odpowiedzialne były za 23% rodzinnych przypadków z grupy FTD (n=57) (Ryc. 3), a jeřli weźmie się pod uwagę tylko rodzinne przypadki z pewnym rozpoznaniem FTD - za 31% (ryc. 4).

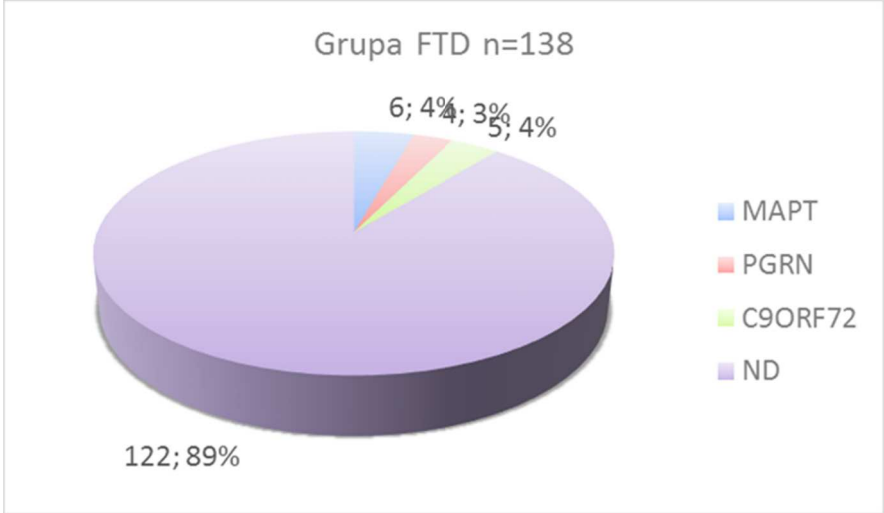
Tabela 4. Zidentyfikowane mutacje u pacjentów z FTD.

	FTD	F1	FTD/ AD	FTD- MND	FTD/ DEP	FTD / PD	FTD / SCHIZ	FTD/ PSP
Liczebnořć	138	97	24	7	2	3	2	3
Rodzinnořć	57	40	12	1	1	1	1	0
Wszystkie mutacje	15/13 ^{&}	12/11	2/2	1/0	0	0	0	0
<i>MAPT</i>	6/6	4/4	2/2	0	0	0	0	0
<i>PGRN</i>	4/4	4/4	0	0	0	0	0	0
<i>C9ORF72</i>	5/3	4/3	0	1/0	0	0	0	0

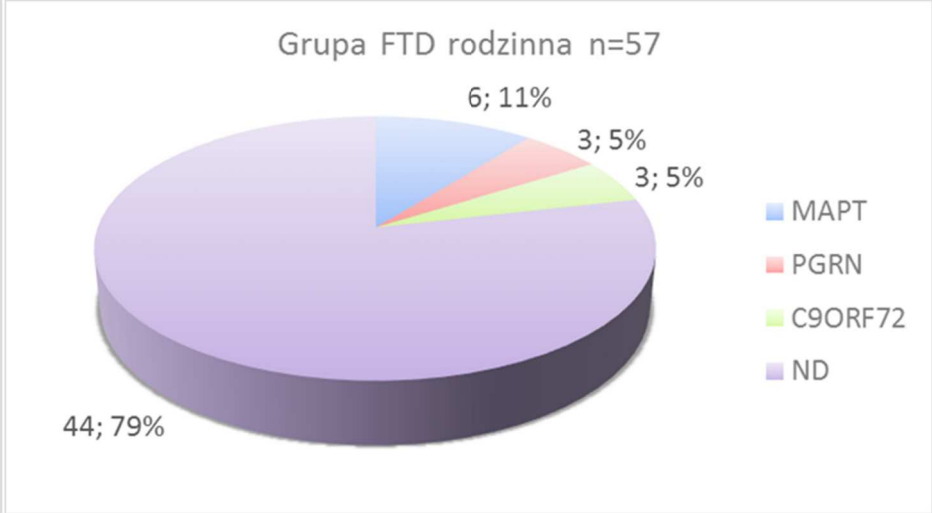
DEP-zaburzenia depresyjne, PD- choroba Parkinsona, SCHIZ –schizofreania, zaburzenia psychiczne.

[&]Liczba pacjentów z mutacj w grupie pacjentów sporadycznych i rodzinnych/ rodzinnych.

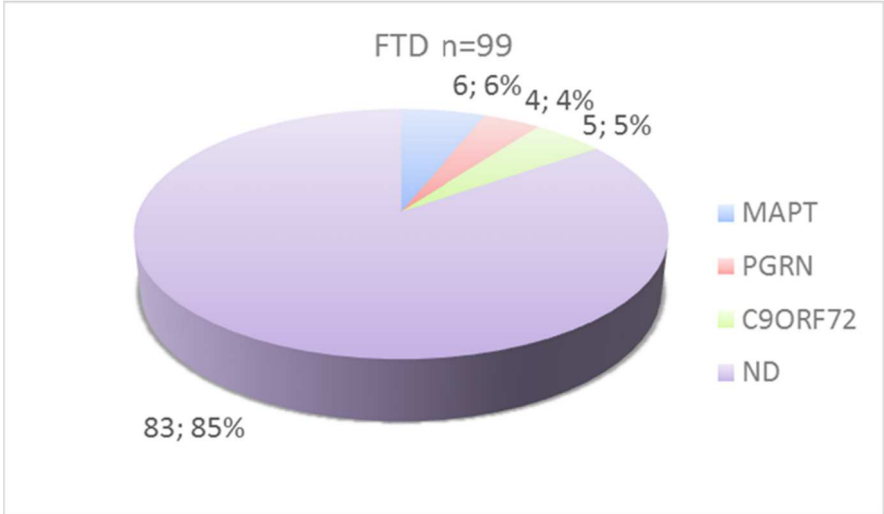
[†] ostateczna diagnoza dwojga pacjentów z grupy z podejrzeniem FTD to FTD



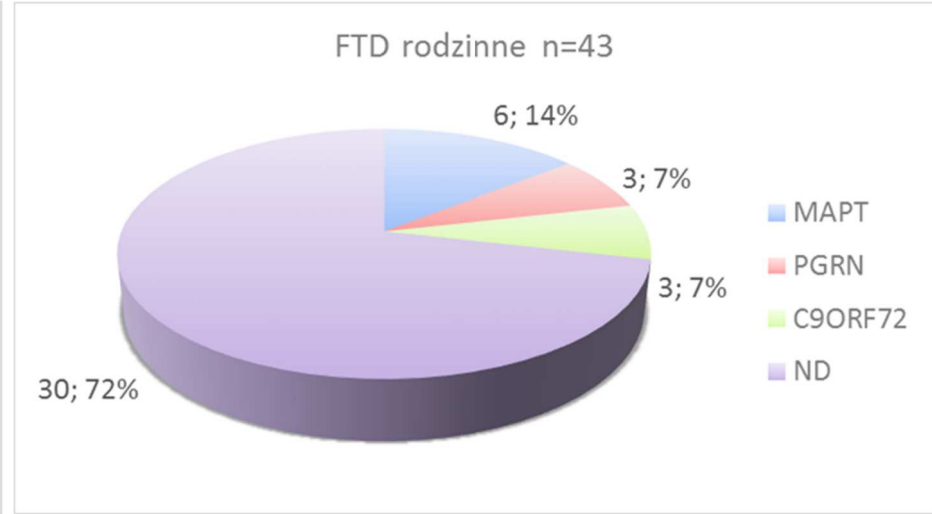
Ryc. 7 Mutacje we wszystkich przypadkach FTD.



Ryc. 5 Mutacje w grupie rodzinnego FTD.



Ryc. 8 Mutacje u chorych z ostateczną diagnozą FTD (F1.)



Ryc. 6 Mutacje w przypadkach rodzinnego FTD (F1).

4.1.1 Gen *MAPT*

W analizowanej sekwencji nukleotydowej genu *MAPT* zidentyfikowano 26 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (Tab. 4), w tym jeden nowy (snpMAPT7). Spośród zidentyfikowanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu piętnaście to warianty intronowe, jeden zlokalizowany jest w 5'UTR, jeden w sekwencji 3'UTR oraz dziewięć wariantów w sekwencji kodującej białko, z czego cztery powodujące zmianę aminokwasu. Najpowszechniejszymi polimorfizmami były: rs2258689 i rs41543317.

Tabela 5. Polimorfizmy w genie *MAPT* zidentyfikowane w badanej grupie FTD.

numer RS	lokalizacja	podstawienie	częstość allelu rzadszego (MAF)	charakter zmiany
rs17650901	17:44039691	A/G	0,106 (G)	Wariant 5'UTR
rs75242405	17:44049329	C/T	0,122 (T)	Wariant intronowy
rs1800547	17:44051846	A/G	0,094 (G)	Wariant intronowy
rs754513	17:44055638	T/A	0,044 (A)	Wariant intronowy
rs754512	17:44055647	A/T	0,044 (T)	Wariant intronowy
rs62063793	17:44064334	T/C	0,037 (C)	Wariant intronowy
snpMAPT7	17:44067301	C/T	0,006 (T)	Polimorfizm typu zmiany sensu (H414Y)
rs143956882	17:44067341	C/T	0,006 (T)	Polimorfizm typu zmiany sensu (S427F)
rs2258689	17:44067382	T/C	0,378 (T)	Polimorfizm typu zmiany sensu (Y441H)
rs10445337	17:44067400	T/C	0,106 (C)	Polimorfizm typu zmiany sensu (S447P)
rs79447161	17:44067508	A/G	0,072 (G)	Wariant intronowy
rs17651754	17:44067546	T/C	0,061 (C)	Wariant intronowy
rs1052551	17:44068924	G/A	0,111 (A)	Polimorfizm synonimiczny (P493)
rs62063845	17:44071294	T/C	0,093 (C)	Polimorfizm synonimiczny (T504)

rs62063850	17:44073739	G/A	0,056 (A)	Wariant intronowy
rs1052553	17:44073889	A/G	0,106 (G)	Polimorfizm synonimiczny (A544)
rs17652121	17:44073973	T/C	0,1 (C)	Polimorfizm synonimiczny (N572)
rs11568305	17:44074018	G/A	0,05 (A)	Polimorfizm synonimiczny (P587)
rs117562189	17:44074133	G/A	0,028 (A)	Wariant intronowy
rs41543317	17:44087500	A/G	0,206 (A)	Wariant intronowy
rs118039425	17:44087508	G/A	0,011 (A)	Wariant intronowy
rs3744460	17:44087629	C/A	0,006 (A)	Wariant intronowy
rs75534191	17:44091724	G/A	0,117 (A)	Wariant intronowy
rs66499584	17:44091780	G/A	0,1 (A)	Wariant intronowy
rs9891103	17:44091886	C/T	0,05 (T)	Wariant intronowy
rs9468	17:44101563	T/C	0,056 (C)	Wariant 3'UTR

W sekwencji nukleotydowej genu MAPT zidentyfikowano cztery zmiany uznane za mutacje patogenne (Tab. 6). Wszystkie mutacje zidentyfikowano u pacjentów z rodzinną postacią FTD. Mutację P301L zidentyfikowano u trzech pacjentów i jest ona mutacją występującą w populacji polskiej najczęściej. Wszystkie mutacje, z wyjątkiem G55R, były już opisywane wcześniej w innych populacjach i zostały uznane za patogenne.

Tabela 6. Mutacje genu MAPT zidentyfikowane u pacjentów z grupy FTD.

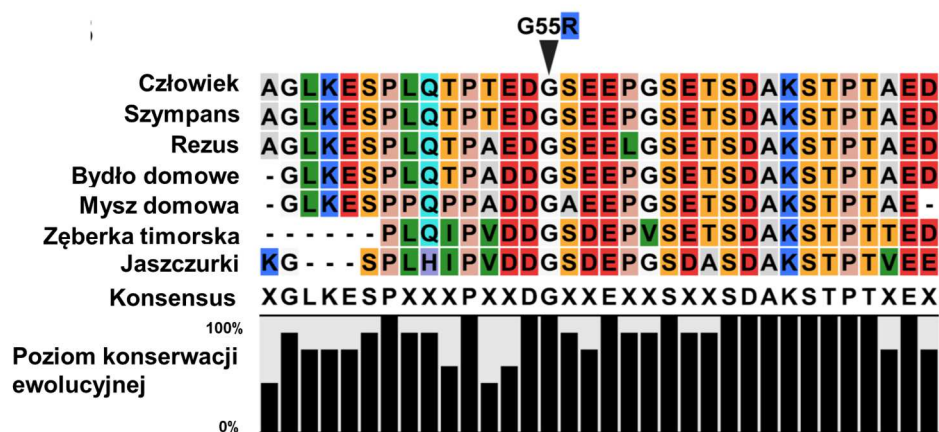
Nazwa mutacji	Rozpoznanie	Wiek zachorowania [lata]	Liczba pacjentów
G55R	FTD	54	1
P301L	FTD	49,3*	3
S305N	FTD	39	1
IVS10+3G>A	FTD/AD	57	1

* Średni wiek zachorowania

4.1.1.1 Mutacja G55R

U 55-letniej pacjentki z rodzinną postacią FTD zidentyfikowano nową heterozygotyczną mutację punktową powodującą zmianę glicyny na argininę w sekwencji aminokwasowej w pozycji 55 (c.163g>a, G55R) [78]. Wspomniana mutacja znajduje się w drugim eksonie, który ulega alternatywnemu składaniu. U probandki nie zidentyfikowano mutacji w genach *PSEN1*, *APP*, *PGRN* i *C9ORF72*. Ze względu na brak materiału od chorych krewnych probandki (ojca, siostry i prawdopodobnie też chorego brata) niemożliwa była analiza kosegregacji mutacji z chorobą. Mutację G55R zidentyfikowano także u dwóch z czterech dorosłych, zdrowych synów, którzy nie osiągnęli wieku możliwego zachorowania. Analiza materiału genetycznego od synów umożliwiła zidentyfikowanie haplotypu H1x związanego z mutacją. Mutacja nie została znaleziona u 150 osób z grupy kontrolnej, co uprawdopodobnia wniosek, że jest mutacją sprawczą.

Mutacja powoduje zmianę niepolarną alifatyczną glicyny na zasadową argininę w silnie kwasowym regionie białka. Analiza *in silico* sekwencji przy użyciu programów ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il>), SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>) i BLAST wykazała, iż reszta G55 jest silnie konserwowana w ewolucji (Ryc. 9).



Ryc. 9 Analiza stopnia zmienności sekwencji białka tau w ewolucji. Kolory oznaczają naturę aminokwasu: czerwony – kwasowy, niebieski - zasadowy, pomarańczowy - hydrofilowy, zielony - hydrofobowy (wg Iyer i wsp 2013).

4.1.1.2 Mutacja P301L

W badanej grupie pacjentów z FTD zidentyfikowano mutację punktową w eksonie 10, powodującą zmianę w pozycji 301 proliny w leucynę (g.123790C>T, P301L). Mutację zidentyfikowano u 3 pacjentów z grupy badanej (mężczyźni, wiek zachorowania: pacjent 1-54 lata, 2-50 i 3-44), a rozszerzając o chorych członków rodzin probandów, u kolejnych dwóch chorych osób (siostra pacjenta 2, wiek zachorowania - 51 lat i brat pacjenta 3, wiek zachorowania - 48 lat) [79]. Analiza wywiadu rodzinnego dwóch probandów (pacjentów 2 i 3) pozwala przypuszczać, że mogli mieć w nieodległej przeszłości wspólnego przodka (aczkolwiek członkowie obu rodzin nic o takim nie wiedzą). Mutacja P301L u wszystkich nosicieli jest związana z haplotypem H1d. Wspomniana mutacja jest najczęstszą mutacją *MAPT* powodującą FTD w Polsce, a także jedną z częstszych mutacji genu *MAPT* (do chwili obecnej opisano ją u ponad 30 rodzin w różnych populacjach). Wspomniana mutacja powoduje drastyczną zmianę konformacji białka, zwłaszcza motywu PGGG w obrębie domeny wiązania mikrotubul.

4.1.1.3 Mutacja S305N

U 39-letniego pacjenta z rozpoznaniem FTD/AD zidentyfikowano w eksonie 10 genu *MAPT* mutację typu zmiany sensu, powodującą podstawienie asparaginy w miejsce seryny w pozycji 305 (g.123802G>A, S305N). Jest to mutacja znana i opisana jako patogenna, znajdowana do tej pory głównie w populacji japońskiej.

4.1.1.4 Mutacja IVS10+3G>A

Kolejna zidentyfikowana mutacja w genie *MAPT* to substytucja guaniny w adeninę w intronie 10 (g.123806G>A, IVS10+3G>A). Heterozygotyczną zmianę zidentyfikowano u jednego pacjenta z grupy FTD (wiek zachorowania - 57 lat). Obecność mutacji potwierdzono także u siostry pacjenta - chorej z rozpoznaniem FTD (wiek zachorowania - 59 lat). Mutacja jest związana z haplotypem H1s .

4.1.2 Gen *PGRN*

W analizowanej sekwencji genu *PGRN* zidentyfikowano 12 wariantów polimorficznych, w tym jeden wcześniej nieopisany (snPGRN8) (Tab. 7). Jednym

z wariantów jest częsta insercja 4 nukleotydów w intronie 3, pozostałe to zmiany pojedynczego nukleotydu. Zidentyfikowano warianty polimorficzne zlokalizowane w następujących regionach *PGRN*: 3'UTR (jedna zmiana), introny (pięć wariantów), eksony (sześć zmian sekwencji z czego dwie to mutacje zmiany sensu). Najczęstsze zmiany to: rs5848, rs67679017 oraz rs850713. U jednego pacjenta z rozpoznaniem FTD zidentyfikowano polimorfizm rs60100877, którego konsekwencją może być alternatywne składanie transkryptu.

Tabela 7. Polimorfizmy *PGRN* zidentyfikowane u pacjentów z grupy FTD.

Numer rs	Lokalizacja	podstawienie	częstość allelu rzadszego (MAF)	charakter zmiany
rs63750742	17:42426631	C/T	0,01 (T)	Polimorfizm synonimiczny (D33)
rs60100877	17:42426926	G/A	0,003 (A)	Wariant wpływający na alternatywny splicing
rs9897526	17:42426940	G/A	0,101 (A)	Wariant intronowy
rs67679017	17: 42427550 -42427551	insercja GTCA	0,208 (GTCA)	Wariant intronowy
rs25646	17:42427630	T/C	0,01 (C)	Polimorfizm synonimiczny (D128)
rs850713	17:42427732	G/A	0,208 (A)	Wariant intronowy
rs72824736	17:42428538	G/A	0,047 (A)	Wariant intronowy
snpPGRN8	17:42428678	G/C	0,003 (C)	Wariant intronowy
rs63750142	17:42428798	G/A	0,003 (C)	Polimorfizm synonimiczny (S301)
rs63750541	17:42428954	G/A	0,003 (A)	Polimorfizm typu zmiany sensu (A324T)
rs369538000	17:42429469	C/T	0,003 (T)	Polimorfizm synonimiczny (I422)
rs63750412	17:42429500	C/T	0,003 (T)	Polimorfizm typu zmiany sensu (R433W)
rs5848	17:42430244	C/T	0,255 (T)	Wariant 3'UTR

W badanej grupie pacjentów ze zdiagnozowanym FTD zidentyfikowano cztery różne mutacje, spośród których 3 zidentyfikowano u pacjentów z rodzinną postacią choroby (Tab. 8). Mutacje G35fsX19 i Arg418X zostały zidentyfikowane wcześniej w innych

populacjach, natomiast mutacje D317fsX12 i P439_R440fsX6 zostały rozpoznane po raz pierwszy w badanej grupie.

Tabela 8. Mutacje *PGRN* u pacjentów z FTD.

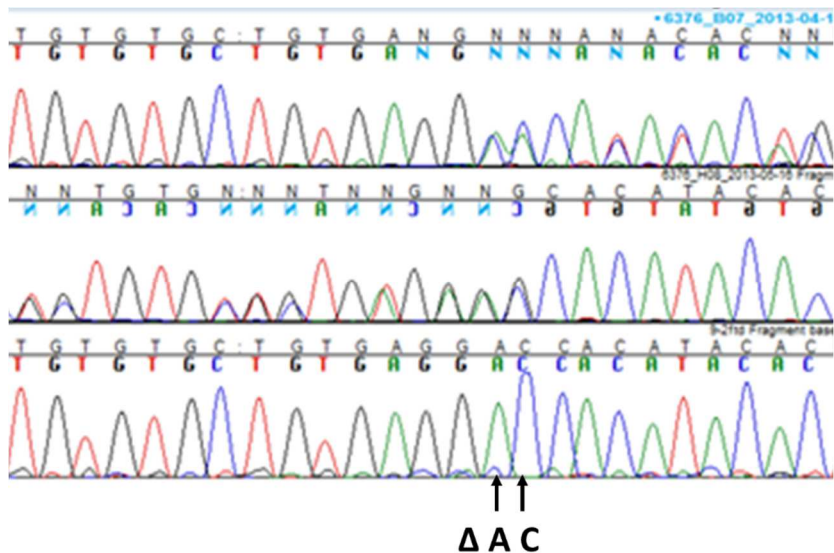
Nazwa mutacji	Rozpoznanie	Wiek zachorowania	Liczba pacjentów
G35fsX19	FTD	57	1
D317fsX11	FTD	65	1
R418X	FTD	60	1
P439_R440fsX6	FTD	64	1

4.1.2.1 Mutacja G35fsX19

U 57-letniej pacjentki z rozpoznaniem FTD i dodatnim rodzinnym wywiadem choroby otępiennej zidentyfikowano delecję jednego nukleotydu w eksonie 1 (g.102delC, G35fsX19). Mutację zidentyfikowano także u zdrowej, 29-letniej córki pacjentki. Mutacja prowadzi do zmiany ramki odczytu i w rezultacie do wprowadzenia kodonu stop w eksonie 2. Wspomniana mutacja jest znana i została opisana jako mutacja sprawcza w innych populacjach [33,80,81].

4.1.2.2 Mutacja D317fsX11

U 65-letniego pacjenta z rodzinną postacią FTD zidentyfikowano nową delecję dwóch nukleotydów (Ryc. 10) w eksonie 9 (g. 2402_2403delAC, p.D317fsX12). Mutację zidentyfikowano u kolejnych dwóch, również chorych na FTD, członków rodziny pacjenta: siostry (wiek zachorowania: 58 lat) i brata (64 lata). Mutacja powoduje zmianę ramki odczytu w kodonie 317 i wprowadza kodon stop w pozycji 328. Mutacji nie zidentyfikowano w grupie pozostałych pacjentów z FTD.



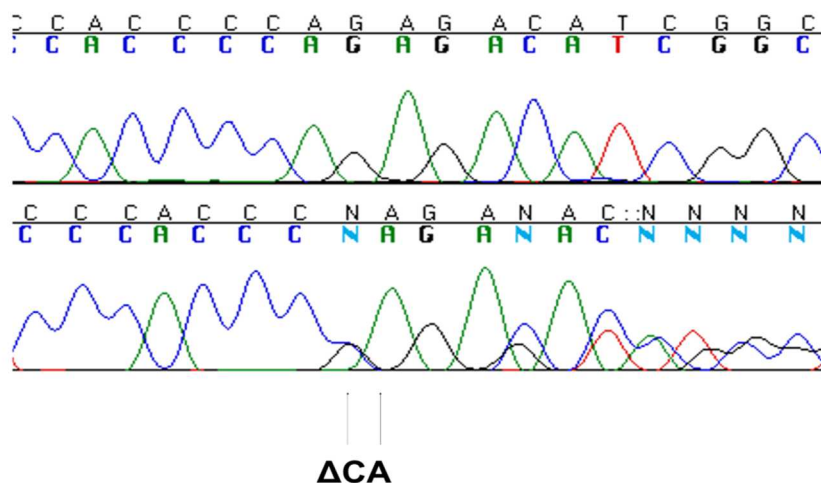
Ryc. 10 Elektroforegram przedstawiający mutację g. 2402_2403delAC. Górna i środkowa sekwencja przedstawia wynik sekwencjonowania eksonu 9 *PGRN* pacjenta z mutacją (sekwencjonowanie z użyciem starterów: (odpowiednio: 5' i 3')). Dolna sekwencja bez mutacji.

4.1.2.3 Mutacja R418X

U 60-letniego pacjenta z rozpoznaniem FTD zidentyfikowano podstawienie cytozyny w tyminę w eksonie 10 (g.2923C>T, Arg418X). Jest to mutacja typu nonsense wprowadzająca kodon stop w pozycji 418. Mutacji nie zidentyfikowano w grupie pacjentów z FTD i grupie kontrolnej. Mutacja została opisana jako mutacja sprawcza w innych populacjach [32,33,82,83,84].

4.1.2.4 Mutacja P439_R440fsX6

U 64-letniego pacjenta z rodzinną historią FTD i FTD z chorobą Parkinsona, sugerującą dziedziczenie autosomalne dominujące, analiza sekwencji nukleotydowej genu *PGRN* wykazała nową dwunukleotydową delecję (ryc. 22) w eksonie 11 (g.2988_2989delCA, P439_R440fsX6) [85]. Mutacja ta została zidentyfikowana również u chorego brata badanego pacjenta (57 lat). Powoduje ona zmianę ramki odczytu w kodonie 441 i wprowadza kodon stop w pozycji 444. Mutacja nie została zidentyfikowana w grupie kontrolnej (n=200).



Ryc. 11 Elektroforegram przedstawiający heterozygotyczną mutację g.2988_2989delCA genu *PGRN*. Dolna sekwencja przedstawia wynik sekwencjonowania pacjenta z zaznaczoną mutacją. Górna sekwencja przedstawia wynik sekwencjonowania badanego fragmentu bez mutacji.

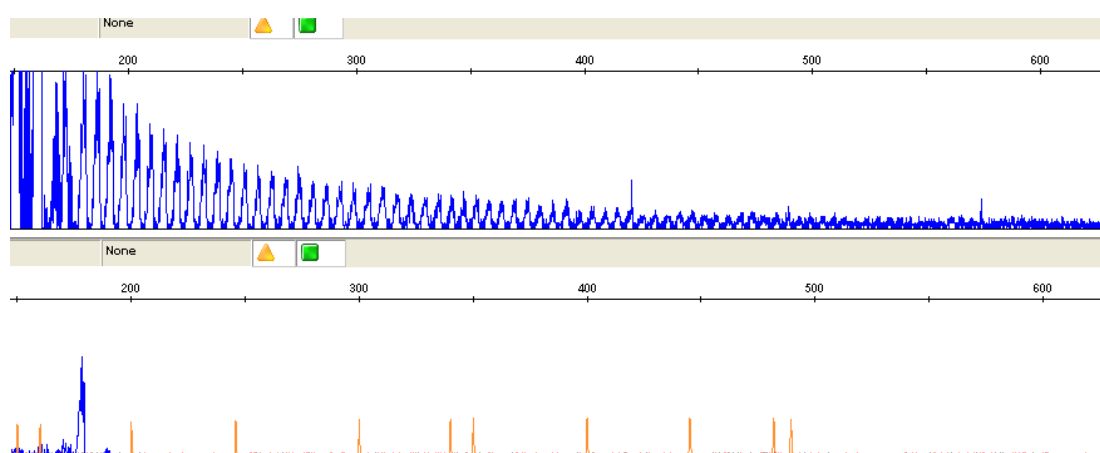
Analiza poziomu ekspresji mRNA genu *PGRN* u pacjenta wykazała dwukrotne obniżenie ilości transkryptów w porównaniu z grupą kontrolną, zaś amplifikacja PCR z wykorzystaniem specyficznego dla mutacji startera wykazała brak zmutowanego cDNA (Ryc. 12).



Ryc. 12 Wynik amplifikacji PCR z wykorzystaniem starterów specyficznego do mutacji (g.2988 2989delCA). Przedstawiony wynik amplifikacji: *PGRN* (linia 1 gDNA (153bp); 2 cDNA) i *ACTB* (4 cDNA (83bp)). 3 marker wielkości 1000bp (najniższy marker 250 bp).

4.1.3 Gen *C9ORF72*

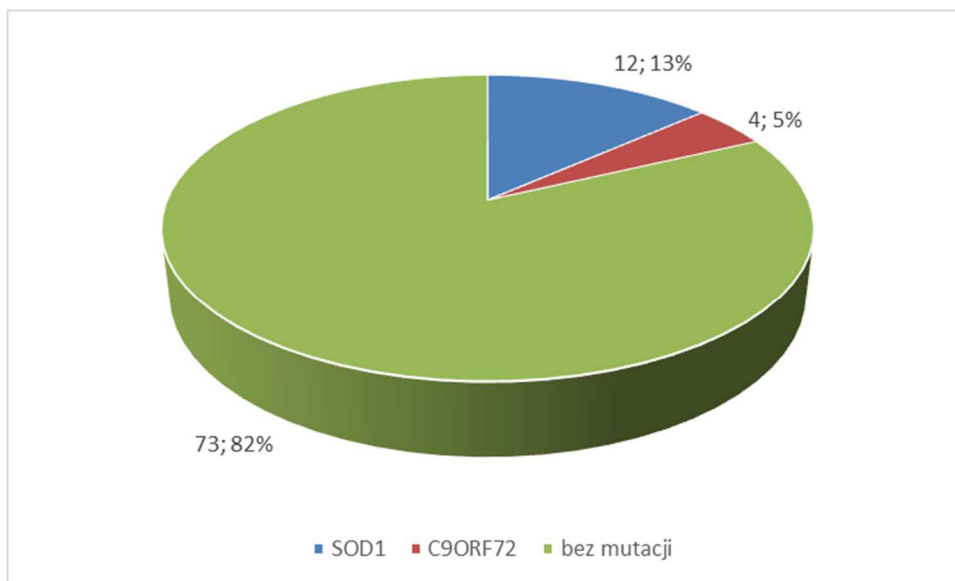
U czterech niespokrewnionych pacjentów z FTD (w trzech przypadkach rodzinna postać choroby oraz jeden przypadek sporadyczny) i jednego pacjenta z rozpoznaniem FTD-MND (ujemny wywiad rodzinny) zidentyfikowano zmianę polegającą na znacznym (>50x) zwiększeniu liczby powtórzeń sekwencji heksanukleotydomowej GGGGCC w 1 intronie *C9ORF72* (ryc. 13). Wspomniana zmiana jest uznawana za mutację sprawczą w patogenezie FTD. Mutacje w *C9ORF72* odpowiedzialne są za około 4% chorób w grupie FTD i około 7% u pacjentów z rodzinną postacią choroby. Mutacji w *C9ORF72* nie znaleziono w grupie kontrolnej (n=257).



Ryc. 13 Przykładowy wynik analizy elektroforetycznej *C9ORF72*. Górny panel przedstawia zwiększoną (>50) liczbę powtórzeń heksanukleotydomowych. Dolny panel obrazuje pięć powtórzeń w układzie homozygotycznym.

4.2 Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)

W badanej grupie pacjentów z ALS (n=89, ryc. 14), w sekwencji nukleotydomowej genu *SOD1*, zidentyfikowano 8 różnych mutacji u 12 niespokrewnionych pacjentów (Tab. 9). W całej grupie pacjentów z ALS (n=396) zwiększoną (>50) liczbę heksanukleotydomowych powtórzeń zaobserwowano u 17 pacjentów (4,3%). Czwooro ze wspomnianych pacjentów było w grupie osób, u których analizowano również *SOD1*. U czterech pacjentów zidentyfikowano polimorfizm pojedynczego nukleotydu w intronie 3 (rs2234694, MAF=0,02 (C)). Mutacje w obu wymienionych genach zidentyfikowano u 10 spośród 17 pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym (ośmiu pacjentów z mutacją w *SOD1* i dwoje z *C9ORF72*).



Ryc. 14 Mutacje w grupie ALS (n=89).

4.2.1 Gen *SOD1*

Tabela 9. Mutacje *SOD1* u pacjentów z ALS.

Nazwa mutacji	wiek	liczba pacjentów	Wywiad rodzinny
K3E	54,3*	3	+
W32X	44	1	-
G41S	41	1	+
D90A	43	1	Nd
S105L	46	1	Nd
C111Y	53	1	+
L126X	63	1	Nd
L144S	48,5*	3	+

*Średni wiek zachorowania; nd - niepełne dane

4.2.1.1 Mutacja K3E

U trojga pacjentów z rodzinną postacią ALS zidentyfikowano nową mutację, powodującą zmianę lizyny w kwas glutaminowy w kodonie 3 (c.158A>G, K3E) w eksonie 1 [86]. Wspomnianą mutację, przy współpracy z zespołem dr. Mitsuya Mority z Jichi Medical University i prof. Tsuji z Department of Neurology, Graduate

School of Medicine, University of Tokyo, zidentyfikowano u kolejnych 2 pacjentów z Polski ze sporadyczną postacią choroby i 3 pacjentów z postacią rodzinną ALS z populacji japońskiej. Obecność mutacji potwierdzono (wliczając członków rodzin probandów) u 9 chorych pacjentów i 4 osób zdrowych poniżej 40 roku życia. Wiek zachorowania u pacjentów z mutacją w populacji polskiej wahał się między 22 a 86 lat (średni wiek zachorowania 54,3 lata), w populacji japońskiej - 26-86 lat (60,7 lat). Mutacji nie zidentyfikowano u 349 polskich pacjentów z ALS oraz 491 z Japonii, a także u 338 osób z grupy kontrolnej. Wspomniana mutacja to najczęstsza w populacji polskiej mutacja, powodująca ALS 2% ze wszystkich przypadków ALS (n= 395)[‡] i 21% z przypadków rodzinnych [86].

Analiza sekwencji aminokwasowej SOD1 z wykorzystaniem programów ConSurf i SIFT wskazuje, iż aminokwas K3 jest konserwowany ewolucyjnie, a substytucja K/E jest substytucją nie tolerowaną (*damaging, non-tolerated substitution*). Także program PolyPhen-2 przewiduje, że substytucja ta jest prawdopodobnie niszcząca z wynikiem 0,818 (czułość 0,84, specyficzność 0,93). Mutacja K3E powoduje zmianę aminokwasu zasadowego na kwasowy, analiza strukturalna modelu białka SOD1 wykazała zaś zmianę w otoczeniu K3 (3 aminokwasy o charakterze kwasowym i 3 zasadowe → 4 kwasowe i 2 zasadowe).

Analiza haplotypu polskich i japońskich członków rodzin pozwoliła po części określić haplotyp związany z mutacją (tab. 10). Analiza haplotypu wykazała, że w polskiej populacji z mutacją K3E związane są cztery różne haplotypy, podczas gdy w populacji japońskiej nosiciele dzielą prawdopodobnie jeden haplotyp. Z powodu ograniczeń związanych z liczbą próbek DNA nie było możliwe pełne określenie współwystępowania alleli tworzących haplotyp z mutacją (fazowanie).

[‡] n=395 obejmowało analizę *SOD1* 89 pacjentów badanych przez mnie i 306 przez zespół dr. Mitsuya Morita

Tabela 10. Allele powiązane z mutacją K3E u polskich i japońskich nosicieli mutacji. (Podane liczby to długość allelu w parach zasad).

	D21S 263	Hamlet	Macbet	Shylock	S O D I K 3 E	Goneril	D21S 223	D21s 63
Rodzina A	172*	146*	238*	137*		176*	83*	103*
Rodzina B	177	153 lub 157	236	129 lub 137		176	85 lub 87	96 lub 103
Rodzina C	172*	146* lub 153	238*	129 lub 137*		176	83* lub 85	101 lub 103*
Proband D	177/ 195	157/ 159	238/ 242	129/133		174/176	85/85	95/107
Proband E	177/ 195	155/ 157	238/ 240	129/133		174/176	85/87	97/107
Proband F	177/ 195	153/ 157	238/ 242	129/133		176/176	85/87	97/107
Japonia ¹	177 lub 195	157	238	129 lub 133		176	85	107
Pacjent G	172 lub 177	153 lub 157	230 lub 238	129 lub 137		176	80 lub 83	92 lub 103
Pacjent H	177 lub 197	153 lub 157	236	129 lub 137		176	83	103

*Prawdopodobne wspólne allele dla rodziny A i C;¹Allele wspólne dla pacjentów z Japonii (D, E i F).

4.2.1.2 Mutacja W32X

U pojedynczego pacjenta ze sporadyczną postacią choroby zidentyfikowano heterozygotyczną substytucję guaniny w adeninę, powodującą wprowadzenie kodonu stop w pozycji 32 (c.246G>A, W32X) eksonu 2. Jest to mutacja zidentyfikowana po raz pierwszy.

4.2.1.3 Mutacja G41S

Mutacje G41S (c.272G>A) zidentyfikowano u jednego pacjenta z rodzinnym ALS [87]. Zmiana glicyny na serynę w kodonie 41 spowodowana substytucją guaniny w adeninę w eksonie 2 opisana była wcześniej jako patogenna w populacji włoskiej [73]. Analiza rodowodu obejmującego 79 członków rodziny w 6 pokoleniach umożliwiła rozpoznanie siedmiorga chorych na stwardnienie zanikowe boczne, spośród których u trzech przeprowadzono testy genetyczne i potwierdzono nosicielstwo wspomnianej mutacji. Wiek zachorowania wahał się między 40 a 69 rokiem życia (50±11,6 lat), choroba

charakteryzowała się szybkim przebiegiem (czas od zachorowania do śmierci $15,0 \pm 3,6$ miesięcy). Obecność mutacji zasadniczo kosegreguje z fenotypem klinicznym choroby, jednak mutację cechuje niepełna penetracja, gdyż nosicielką mutacji była również zdrowa matka probanda. Niepełną penetrację odnotowano także dla innych mutacji *SOD1*, a zjawisko było niekiedy ograniczone do matek probandów.

W celu porównania tła genetycznego mutacji dokonano analizy zmienności ośmiu wysoce heterogennych markerów położonych w obrębie i wokół genu *SOD1*. Analizę prowadzono dla 5 członków polskiej rodziny oraz dla 3 członków rodzin włoskich (zarówno nosiciele mutacji jak i osób jej nie posiadających). Wykazano, że 3 z 8 markerów mieszczących się skrajnie po obu stronach genu mają taką samą postać w rodzinach polskiej i włoskiej. Natomiast 5 pozostałych markerów, położonych bliżej genu, różnicuje rodzinę polską od włoskich (tab. 10). Wyniki te silnie sugerują, iż mutacja w polskiej populacji jest wynikiem niezależnego zdarzenia mutacyjnego.

Tabela 11. Allele związane z mutacją G41S w polskiej rodzinie i rodzinach włoskich.

	D21s 263	Hamlet	Macbeth	Shylock	Yorick	S O D 1	Goneril	D21s 223	D21s63
Rodzina polska	175 pz	153 pz	237 pz*	139 pz	151 pz		185 pz	87 pz	102 pz
Rodziny włoskie	175 pz	153 pz	235 pz	127 pz	139 pz		175 pz (173 w jednej rodzinie)	81 pz	102 pz

* Wytłuszczonym drukiem wskazano markery różniące się wielkością w obu populacjach

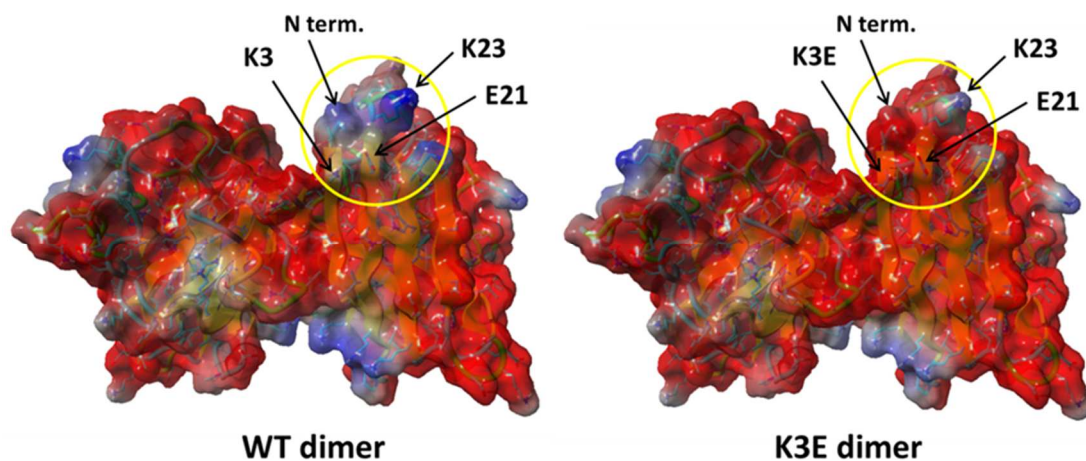
4.2.1.4 Pozostałe mutacje *SOD1*

W badanej grupie pacjentów z ALS (n=89) zidentyfikowano ponadto cztery mutacje uznane za patogenne w innych populacjach. Mutację D90A (c.420A>C, ekson 4) wykryto u pacjenta ze sporadyczną postacią choroby. U pojedynczych pacjentów z rodzinną postacią choroby zidentyfikowano dwie mutacje typu zmiany sensu S105L (c.465C>T, ekson 4) oraz C111Y (c.483G>A, ekson 4), a także jedną mutację terminacyjną L126X (c.528T>A, ekson 5). U trzech nie spokrewnionych pacjentów zidentyfikowano mutację L144S (c.582T>C, ekson 5). Wymienionych wyżej mutacji nie zaobserwowano u 200 osób z grupy kontrolnej, ani u pozostałych pacjentów z grupy ALS.

4.2.1.5 Analiza wpływu wybranych mutacji na strukturę i własności dimeru białka SOD1.

Mutacja K3E powoduje zmianę aminokwasu zasadowego na kwasowy; analiza strukturalna modelu białka SOD1 wykazała zmianę potencjału elektrostatycznego na zewnątrz białka. Powierzchnia dimeru SOD1 jest naładowana ujemnie, ze względu na duży nadmiar reszt kwasowych: 42 reszt Asp i Glu w stosunku do 30 reszt Lys i Arg.

Potencjał elektrostatyczny w otoczeniu prawidłowego aminokwasu w pozycji 3 jest neutralny, natomiast mutacja zmienia go na silnie ujemny. Jednocześnie, cały obszar pomiędzy resztami K3 i K23 staje się ujemny (Rys. 15), włączając w to dodatnio naładowany N-koniec białka, który jednak nie ma wpływu na potencjał z uwagi na sparowanie ładunku z blisko położoną resztą Glu21. Zmiana potencjału tego obszaru nie będzie miała wpływu na trwałość dimeru SOD1, gdyż płaszczyzna oddziaływania białko-białko we wspomnianym dimerze jest tworzona niemal wyłącznie przez oddziaływania hydrofobowe oraz wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami głównymi oddziałujących monomerów. Wpływ mutacji będzie się raczej przejawiał poprzez zmianę charakteru oddziaływania z innymi białkami, tj. brak dopasowania potencjałów elektrostatycznych, a w rezultacie osłabienie siły wiązania.



Ryc. 15 Rozkład potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej dimeru SOD1 WT oraz mutantu K3E. Czerwony kolor oznacza potencjał ujemny, natomiast niebieski – dodatni. Obszar zmian w potencjale elektrostatycznym zaznaczono żółtą obwódką.

G41S

Symulacja wpływu mutacji G41S na strukturę białka SOD1 wykazała usztywnienie pętli G37-G41 pomiędzy dwiema β -karkami. Usztywnienie jest powodowane możliwością utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy łańcuchem bocznym zmutowanej reszty S41, a grupą karbonylową Glu40 lub Thr39, położonych w łańcuchu głównym. Usztywniona pętla nie może akomodować zmiany struktury białka spowodowanej przez oddziaływanie z innym białkiem, co osłabia ich siłę. Krótka pętla G37-G41 zaczyna się i kończy resztą glicyny, co wskazuje, że jej mobilność i giętkość ma potencjalnie duże znaczenie dla funkcji SOD1.

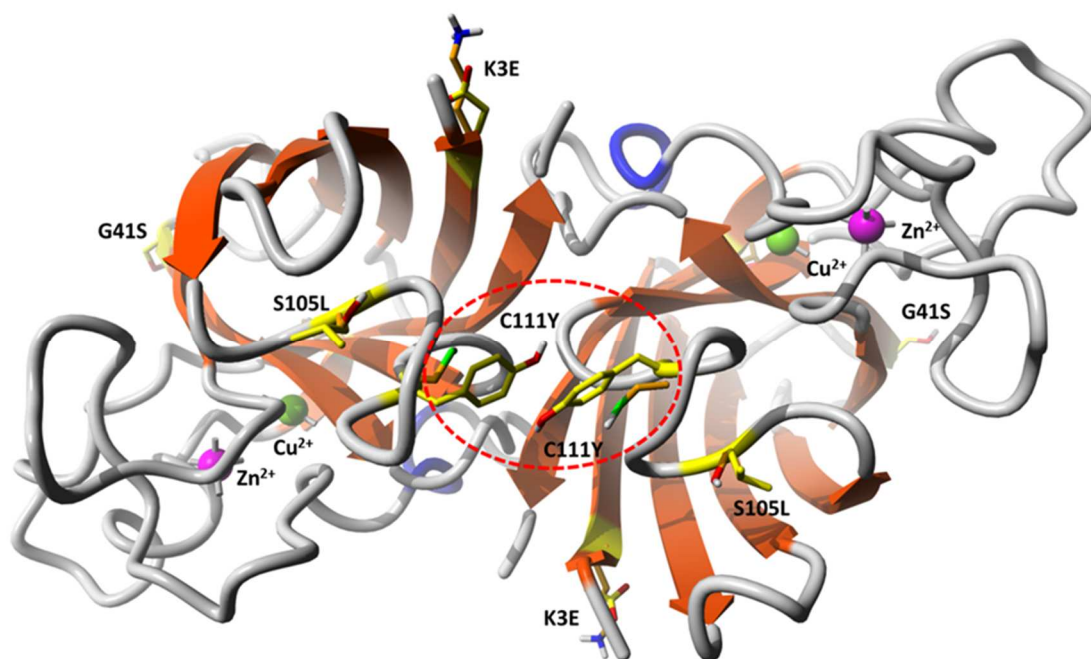
S105L

Reszta aminokwasowa w pozycji 105 jest zlokalizowana w długiej pętli S102-G114. Mutacja powoduje utratę wiązania wodorowego S105-Q22. Wiązanie S105 z resztą Q22, która zlokalizowana jest na β -karcie, powoduje zwiększenie stabilności wspomnianej pętli. Podobne znaczenie mają inne wiązania wodorowe w tej pętli: V103(C=O)-H110, L106(N-H)-Q22, S105(C=O)-I112(N-H) oraz C111(C=O)-R115. Reszta R115 znajduje się na sąsiedniej β -karcie, co dodatkowo usztywnia pętlę. Pętla S102-G114 kształtuje zagłębienie pomiędzy dwoma monomerami białka SOD1, które może być rozpoznawane przez inne białka, dlatego usztywnienie pętli może być warunkiem niezbędnym do wiązania partnerów białkowych. Wzrost giętkości pętli wskutek utraty wiązania wodorowego S105-Q22 raczej nie powinien mieć wpływu na własności katalityczne, ze względu na dużą odległość wspomnianej pętli do miejsca aktywnego SOD1.

C111Y

Reszta 111 znajduje się w tej samej pętli, co omówiona wyżej reszta w pozycji 105. Zamiana cysteiny na tyrozynę w pozycji 111 białka SOD1 powoduje znaczącą zmianę kształtu płaszczyzny oddziaływania pomiędzy monomerami SOD1, a zatem mutacja C111Y może wpływać na wiązanie partnerów białkowych SOD1. Ponadto dwie tyrozyny w pozycji 111 z sąsiednich monomerów mogą utworzyć połączenie typu π - π (stackingowe, *face to face*), poprzez oddziaływanie ich pierścieni benzenowych (Rys. 16), co dodatkowo zmniejsza wielkość bruzdy między monomerami, co może

utrudnić bądź uniemożliwić wiązanie partnerów białkowych rozpoznających kształt bruzdy.



Ryc. 16 Mutant C111Y SOD1. Obszar mutacji zaznaczono czerwonym owalem. Pokazano także położenie innych bliskich mutacji tego białka (K3E, S105L oraz G41S). Kolorem żółtym zaznaczono reszty zmutowane. Reszty przed mutacją pokazano w kolorze pomarańczowym.

L144S

Reszta 144 znajduje się blisko powierzchni białka SOD1 i jest oddalona od płaszczyzny oddziaływania dimeru. Otoczenie L144 stanowiące wewnątrz struktury utworzonej przez zakrzywione β -kartki jest hydrofobowe (tzw. " β -beczka"). Podstawienie hydrofilowej seryny w pozycji 144 może powodować zmianę ustawienia dwu sąsiednich zewnętrznych pętli między β -niemi tworzącymi wspomnianą strukturę β -beczki. Ponadto zwiększone oddziaływanie cząsteczek wody z tym rejonem może w następstwie powodować przesunięcie niektórych β -nici i modyfikację miejsca katalicznego, znajdującego się po zewnętrznej stronie β -beczki.

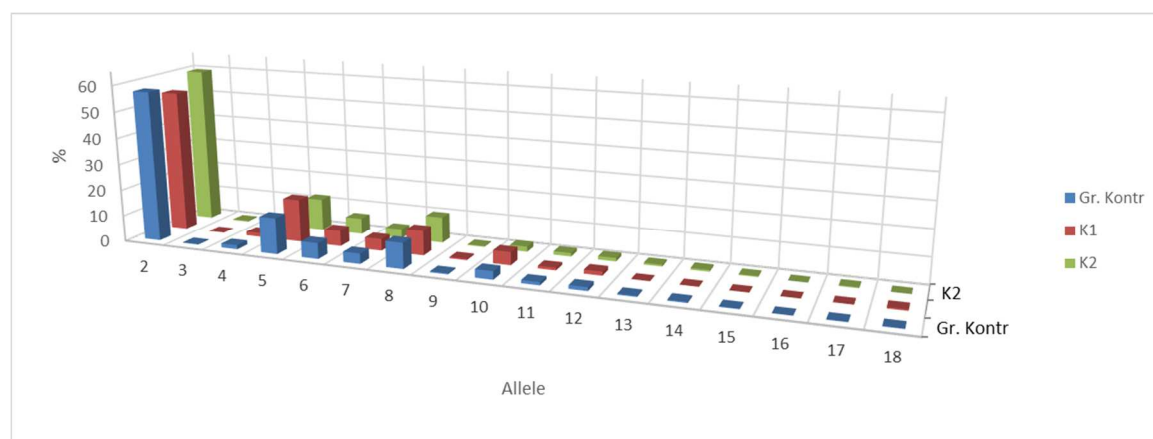
4.2.2 Gen *C9ORF72*

Spośród 396 pacjentów z ALS u 17 zidentyfikowano heterozygotyczną zmianę w *C9ORF72*, polegającą na znacznym zwiększeniu liczby heksanukleotydowych

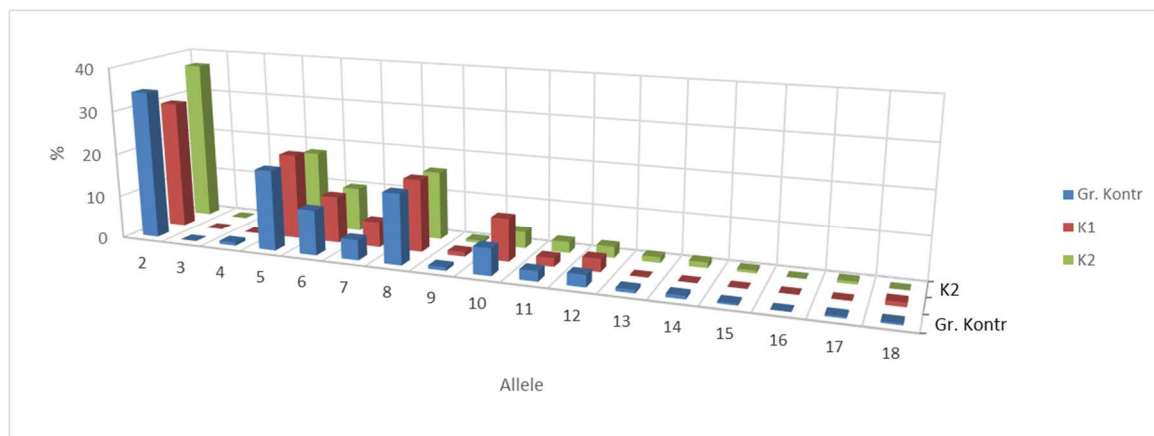
powtórzeń GGGGCC. Mutacja ta, określana jako najczęstsza przyczyna ALS w innych populacjach, w badanej grupie była przyczyną 4,3% przypadków. Mutacji w genie *C9ORF72* nie znaleziono w grupie kontrolnej (n=257).

4.3 Analiza genu *C9ORF72*

Grupa kontrolna (n=258) obejmowała dwie podgrupy: grupę ludzi starszych (powyżej 65 roku życia), przebadanych neurologicznie (n=101) (K1) oraz grupę młodszą, złożoną z osób deklarujących brak jakichkolwiek chorób (n=156) (K2). Analiza liczby heksanukleotydowych powtórzeń *C9ORF72* w całej grupie kontrolnej wykazała brak mutacji. Zakres powtórzeń wahał się od 2 do 18; średnia liczba powtórzeń wynosiła $4,16 \pm 3,37$, zaś allelu dłuższego $5,59 \pm 3,33$ (odpowiednio dla podgrup: K1 2-18; $4,29 \pm 2,95$; $5,83 \pm 3,21$ i K2 2-17; $4,07 \pm 2,99$; $5,44 \pm 3,39$). Częstości występowania alleli o różnych długościach w grupie kontrolnej przedstawiają ryc. 17 i ryc. 18.



Ryc. 17 Częstości występowania alleli o różnej długości w grupie kontrolnej



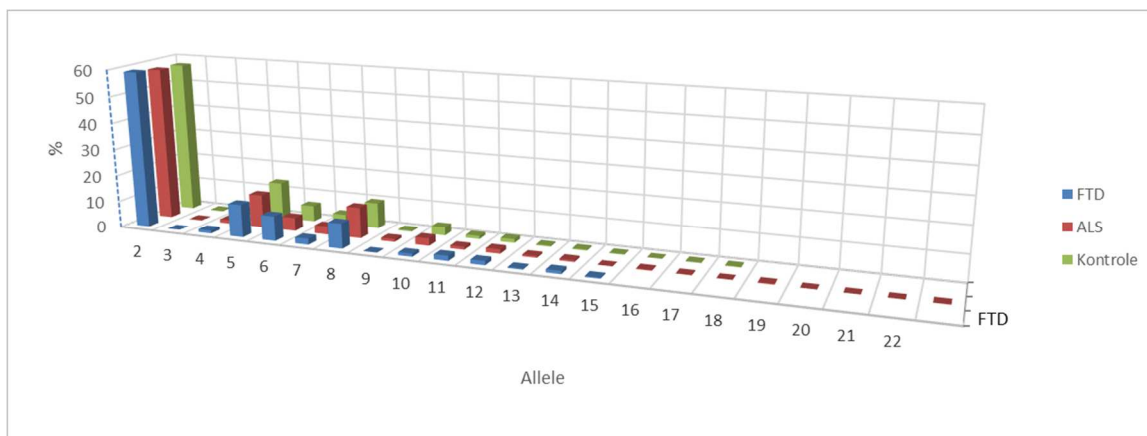
Ryc. 18 Częstości występowania alleli „dłuższych” w grupie kontrolnej

Grupa pacjentów z FTD

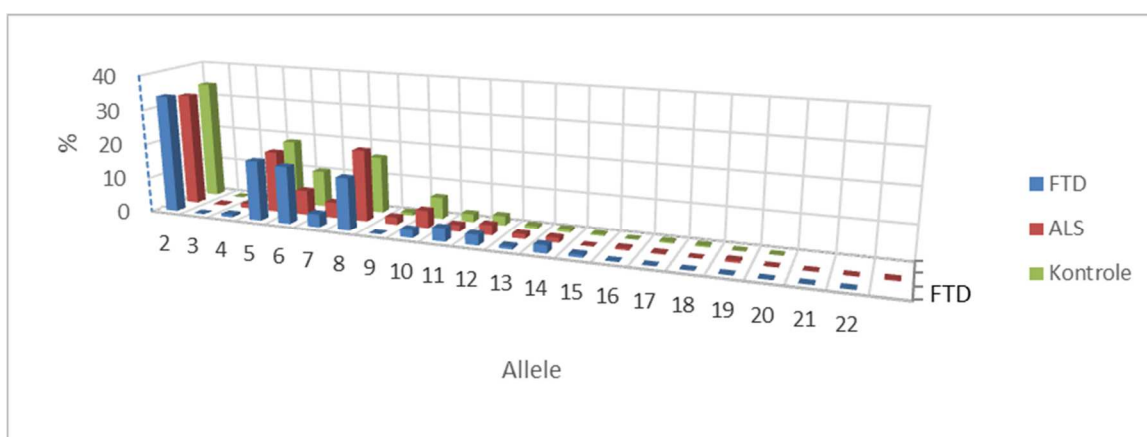
W grupie pacjentów z FTD u pięciorga osób zidentyfikowano zwiększoną liczbę powtórzeń GGGGCC w genie *C9ORF72*. U pozostałych 133 osób zakres powtórzeń wahał się od 2 do 15; średnia liczba powtórzeń wynosiła $4,08 \pm 2,96$, zaś allelu dłuższego $5,56 \pm 3,29$. W grupie pacjentów (z wyłączeniem osób ze zwiększoną liczbą powtórzeń) z ostateczną diagnozą FTD wartości te wynosiły odpowiednio $4,12 \pm 2,98$ i $5,46 \pm 3,39$.

Grupa pacjentów z ALS

Analiza liczby heksanukleotydowych powtórzeń *C9ORF72* w całej grupie pacjentów z ALS ($n=396$) pozwoliła zidentyfikować 17 pacjentów ze znacznie zwiększoną liczbą powtórzeń (wynosiła ona co najmniej 50). U pozostałych ($n=379$) liczba powtórzeń wahała się od 2 do 23; średnia liczba powtórzeń wynosiła $4,28 \pm 3,22$, zaś allelu dłuższego $5,87 \pm 3,58$.



Ryc. 19 Częstości występowania alleli różnej wielkości w poszczególnych grupach badanych.



Ryc. 20 Częstości występowania alleli („dłuższych”) różnej wielkości w poszczególnych grupach badanych. „Dłuższe” allele – allele z pary alleli o równej lub większej liczbie heksanukleotydowych powtórzeń.

Analiza statystyczna z zastosowaniem testu χ^2 nie wykazała różnic w rozkładzie długości alleli między grupą FTD i grupą kontrolną (wszystkie: $p=0,732$, dłuższe: $p=0,913$) oraz grupą ALS i grupą kontrolną ($p=0,491$ / $p=0,328$).

4.4. Analiza możliwego znaczenia fenotypowego dwóch wybranych polimorfizmów genu *PGRN* w FTD i ALS

4.4.1 Polimorfizm rs850713 (17:42427732G>A) *PGRN*

Częstości występowania alleli i genotypów polimorfizmów rs850713 w badanych grupach FTD i ALS znajdują się w równowadze Hardy’ego i Weinberga ($p>0,05$), natomiast w grupie kontrolnej stwierdzono nieznaczne odchylenie od równowagi Hardy’ego i Weinberga ($p=0,02$), bez wpływu na wyniki dalszych analiz.

Analiza jednoczynnikowa nie wykazała istotnych statystycznie różnic w częstości alleli rs850713 (17:42427732G>A) w grupach badanych FTD oraz w grupie ALS w porównaniu z kontrolą. Natomiast w grupie FTD analiza jednoczynnikowa wykazała związek genotypu AA (p=0.032) z niższym ryzykiem FTD. Wspomniany genotyp jest związany na poziomie trendu (p=0,062) w grupie ALS z niższym ryzykiem choroby (Tab.11)

Tabela 11. Zestawienie częstości genotypów i alleli rs850713 (g.42427732G>A) *PGRN* w grupach FTD i ALS w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu χ^2 lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

	<i>PGRN</i> , rs850713 G>A	FTD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	ALS, n(%)
Genotypy	GG	79 (53,3)	135 (52,5)	211 (53,3)
	GA	51 (38,6)	91 (35,4)	153 (38,6)
	AA	8 (8,1)	31 (12,1)	32 (8,1)
	Test χ^2 (df=2)	p=0,135		p=0,222
	GG vs. AA+TT	p=0,398 [OR=1,21, 95% CI 0,78-1,87]		p=0,873 [OR=1,03, 95% CI 0,74-1,43]
	GA vs. GG+AA	p=0,826 [OR=1,07, 95% CI 0,68-1,68]		p=0,409 [OR=1,149, 95% CI 0,82-1,61]
	AA vs. GG+GA	p=0,032 [OR=0,45, 95% CI 0,18-1,06]		p=0,062 [OR=0,64, 95% CI 0,37-1,11]
Allele	G	209 (75,7)	361 (70,2)	575 (72,6)
	A	67 (24,3)	153 (29,8)	217 (27,4)
	Test χ^2 (df=1)	p=0,101		p=0,379

4.4.2 Polimorfizm rs5848 (17:42430244C>T) *PGRN*

Częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów rs5848 w badanych grupach (FTD, ALS i grupie kontrolnej) znajdują się w równowadze Hardy'ego i Weinberga (p>0,05).

Analiza jednoczynnikowa nie wykazała istotnych statystycznie różnic w częstościach alleli i genotypów rs5848 w grupach badanych FTD oraz ALS w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 12).

Tabela 12. Zestawienie częstości genotypów i alleli rs5848 (g.42430244C>T) *PGRN* w grupach FTD i ALS w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu χ^2 lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

	<i>PGRN</i> , rs5848 C>T	FTD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	ALS, n(%)
Genotypy	CC	64 (46,4)	111 (43,2)	168 (42,4)
	CT	63 (45,7)	112 (43,6)	174 (43,9)
	TT	11 (7,9)	34 (13,2)	54 (13,6)
	Test χ^2 (df=2)	p=0,740		p=0,978
	CC vs. TT+CT	p=0,595 [OR=1,14, 95% CI 0,74-1,76]		p=0,872 [OR=0,90, 95% CI 0,70-1,35]
	CT vs. CC+TT	p=0,750 [OR=1,09, 95% CI 0,70-1,68]		p=0,936 [OR=1,015, 95% CI 0,73-1,4]
	TT vs. CC+CT	p=0,078 [OR=0,568 95% CI 0,26-1,21]		p=0,907 [OR=1,036 95% CI 0,638-1,685]
Allele	C	191 (69,2)	334 (65,0)	510 (64,4)
	T	85 (30,8)	180 (35,0)	282 (35,6)
	Test χ^2 (df=1)	p=0,237		p=0,859

4.4.3 Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs580713 i rs5848 w genie *PGRN*

Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs850713 i rs5848 wykazała, że znajdują się one w nierównowadze sprzężeń ($D'=0,77$). Polimorfizmy tworzą cztery możliwe haplotypy. Najczęstszym haplotypem jest $G_{rs850713}C_{rs5848}$. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic częstości haplotypów między grupą FTD i grupą ALS a kontrolami (Tab. 13).

Tabela 13. Zestawienie częstości haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs850713 i rs5848 *PGRN* w grupach FTD i ALS w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu χ^2 .

	Haplotyp rs850713 rs5848	Częstość haplotypu u pacjentów [%]	Częstość haplotypu u kontroli [%]	χ^2	p*
F T D	GC	65,9	60,1	2,525	0,112
	AT	21	24,9	1,566	0,211
	GT	9,8	10,1	0,013	0,907
	AC	3,3	4,8	1,018	0,313
A L S	GC	60,5	60,1	0,024	0,877
	AT	23,5	24,9	0,312	0,576
	GT	12,1	10,1	1,167	0,28
	AC	3,9	4,9	0,786	0,375

*p – dotyczy różnicy częstości haplotypów między grupami

5 DYSKUSJA

Znajomość zależności pomiędzy genotypem a fenotypem, a także molekularnych patomechanizmów choroby bardzo często umożliwia diagnostykę różnicową, wyróżniającą podtypy danej jednostki chorobowej wymagające np. odmiennego postępowania. Odkrycie mutacji sprawczych genu *PGRN* odpowiedzialnych za rozwój FTD wytyczyło nowe kierunki badań podstawowych, a także możliwości poszukiwania nowych sposobów leczenia. Ponieważ mutacje *PGRN* powodują obniżenie poziomu granulin, wskazuje się, że efekt terapeutyczny można uzyskać zapewne poprzez podwyższenie ich poziomu u pacjentów [88].

Określenie podłoża genetycznego choroby, jeśli nawet w obecnej chwili nie prowadzi do zaproponowania skutecznego leczenia, ułatwia postawienie pewnej diagnozy i właściwe postępowanie terapeutyczne oraz prowadzenie poradnictwa genetycznego [15].

W genetycznych badaniach asocjacyjnych kluczowym elementem jest zebranie odpowiednio dużej oraz precyzyjnie określonej fenotypowo grupy badanej, a także odpowiednio licznej grupy kontrolnej dobranej pod względem wieku i płci do grupy badanej. Zadanie to wymaga współdziałania klinicystów różnych specjalności oraz zastosowania precyzyjnych kryteriów definiowania fenotypu chorobowego. Ponieważ jednak z praktycznych (a także często i zasadniczych) powodów nie jest możliwa bezsprzeczna diagnoza, w skład grupy badanej wchodzi osoby o niepewnym, bądź błędnym rozpoznaniu klinicznym. Ich odsetek waha się w zależności od jednostki chorobowej, populacji czy sposobu diagnozowania. W przedstawionych w rozprawie badaniach, na przykład w przypadku grupy ALS, w wyniku trwającej kilka lat obserwacji klinicznej pierwotna diagnoza została zmieniona u 18 pacjentów (4,5% grupy badanej). Co więcej: większość pacjentów z ALS nie ma postawionej pełnej diagnozy dotyczącej zaburzeń poznawczych. Jedynie pacjenci z ewidentnymi objawami demencji byli poddawani ocenie neuropsychologicznej dotyczącej zaburzeń poznawczych czy behawioralnych. Z tego powodu udział pacjentów ALS-FTD lub FTD-MND w grupach badanych można uznać za zaniżony.

Podobnie pewną trudność interpretacyjną stanowią nowe warianty sekwencji, zwłaszcza u pojedynczego pacjenta (mutacje prywatne), bez wywiadu rodzinnego

choroby lub przy braku dostępu do historii rodzinnej. Ocena fenotypowego znaczenia tego typu wariantów jest często niejednoznaczna, nawet w wypadku przeprowadzenia badań funkcjonalnych (transkryptów czy produktów białkowych).

Należy przy tym pamiętać, że termin "mutacja" oznacza zasadniczo dowolną, trwałą zmianę sekwencji nukleotydowej DNA organizmu. Jednak w genetyce klinicznej używany jest najczęściej dla określenia mutacji sprawczych, natomiast dowolna zmiana sekwencji DNA określana jest terminem "wariant". "Wariant genetyczny" nie powodujący skutków fenotypowych, określany jest mianem polimorfizmu.

W Polsce nie przeprowadzono dotychczas systematycznych badań zmierzających do poznania częstości występowania mutacji w poszczególnych genach u pacjentów z fenotypem klinicznym FTD, ALS i fenotypami pośrednimi. Jednak w świetle powyższych uwag, wskazujących na wielorakie znaczenie wiedzy o podłożu genetycznym chorób neurodegeneracyjnych, podjęte badania wydają się w pełni uzasadnione zarówno dla nauk podstawowych, jak i praktyki klinicznej.

Analizując sekwencje nukleotydowe badanych genów zidentyfikowano zmiany w zdecydowanej większości już znane – polimorfizmy oraz mutacje sprawcze. Niektóre z mutacji (*MAPT* P301L, *PGRN* R418X, czy *SOD1* D90A) są częstymi przyczynami chorób na świecie, inne były z kolei identyfikowane w pojedynczych rodzinach lub populacjach (*MAPT* S305N, *SOD1* G41S). Przykładowo z ponad 150 mutacji genu *SOD1* jedynie mutacja D90A jest odpowiedzialna za rozwój ALS dziedziczonego w formie autosomalnej dominującej i recesywnej. Około 2-3% populacji północnej Skandynawii to heterozygotyczni nosiciele bez objawów klinicznych choroby. W postaci homozygotycznej wspomniana mutacja jest przyczyną ALS charakteryzującego się wolnym przebiegiem. Natomiast pacjenci z heterozygotyczną mutacją z innych regionów świata, nie mający skandynawskich przodków, rozwijają klasyczne ALS z czasem przeżycia 3-5 lat. Sugeruje to istnienie allelu osłabiającego „siłę” D90A, silnie sprzężonego z mutacją lub w innym *locus* w genomie, ale powszechnego w populacji skandynawskiej [53]. W populacji polskiej najbardziej prawdopodobnym wydaje się sprawczy wpływ wspomnianej mutacji w postaci heterozygotycznej.

Trzy mutacje (*MAPT* G55R, *PGRN* D317fsX11 i P439_R440fsX6,) i dwa warianty genu (*MAPT* snpMAPT7, *PGRN* snpPGRN8) u pacjentów z FTD oraz dwie mutacje (*SOD1*, K3E i W32X) zostały zidentyfikowane po raz pierwszy.

Obie wymienione mutacje *PGRN* powodują zmianę ramki odczytu, wprowadzając wcześniej kodon stop. Z piśmiennictwa i badań własnych wynika, iż mutacje tego typu w *PGRN* to mutacje całkowicie znoszące funkcję kodowanego białka, czego rezultatem jest haploinsuficjencja. W przypadku mutacji P439_R440fsX6 potwierdzono immunohistochemicznie patologię FTLD-U z proteinopatią TDP43. Mimo że mutacja prowadzi do rozwoju otępienia czołowo-skroniowego, przebieg choroby jest różny u członków tej samej rodziny [85].

Mutacja *MAPT* G55R jest jedną z niewielu identyfikowanych w N-końcu białka tau, a pierwszą w ulegającym alternatywnemu składaniu eksonie 2. Mimo braku możliwości sprawdzenia kosegregacji mutacji z chorobą i badań immunohistochemicznych analiza *in silico* wpływu mutacji na strukturę białka, a także badania funkcjonalne (przeprowadzone we współpracy z zespołem prof. Stuarta Feinsteina, nie przedstawione w niniejszej rozprawie), pozwalają uznać zmianę G55R za bardzo prawdopodobną mutację sprawczą dla FTD (Iyer i wsp. 2013). Faktami wspierającymi tę tezę są uzyskane wyniki:

- przebieg choroby i autosomalny dominujący sposób dziedziczenia podobny do innych mutacji *MAPT*,
- zamiana niepolarniej alifatycznej glicyny na zasadową argininę w silnie kwasowym regionie białka,
- zmiana dotyczy silnie konserwowanej w ewolucji pozycji jak i otoczenia w białku,
- mutacja G55R modyfikuje zdolność białka tau do zapoczątkowania polimeryzacji mikrotubul [85].

Dla rozpoznania molekularnego patomechanizmu mutacji potrzebne są jednak dalsze badania funkcjonalne, prowadzone obecnie we współpracy z prof. Stuartem Feinsteinem z Neuroscience Research Institute and Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of California Santa Barbara.

Najpowszechniejszą mutacją w genie *SOD1* w populacji polskiej jest mutacja K3E. Po raz pierwszy została zidentyfikowana i scharakteryzowana w ramach opisanych wyżej badań w populacji polskiej, a później także w populacji japońskiej [86]. Mutację stwierdzono u pacjentów z rodziną (3 w polskiej populacji i 3 w japońskiej populacji) i sporadyczną (2 pacjentów z Polski) postacią ALS. Analiza

występowania mutacji u członków rodzin pacjentów w populacji polskiej i japońskiej wykazała, że mutacja *SOD1K3E* w pełni kosegreguje z chorobą i charakteryzuje się wysoką penetracją. Na niepełną penetrację mutacji K3E w populacji polskiej wskazuje identyfikacja u dwóch pacjentów ze sporadyczną postacią ALS. Brak objawów choroby u trojga nosicieli (wiek - poniżej 40 lat) w rodzinach z ALS nie świadczy o obniżonej penetracji, gdyż pozostali członkowie rodzin zachorowali w późniejszym wieku. Niepełna penetracja różnych mutacji w genie *SOD1* jest zjawiskiem znanym, o wciąż nie wyjaśnionym podłożu [87].

Dalszych badań wymaga określenie patogenności także mutacji *SOD1 W32X*. Opublikowane dotychczas wyniki wskazują, że zmutowane białko *SOD1*, poprzez zmiany konformacji, przechodzi w formę nierozpuszczalną i wykrywane jest w postaci agregatów w rdzeniu kręgowym pacjentów [89]. Uważana za najbardziej prawdopodobną hipoteza dotycząca patomechanizmu mutacji *SOD1* postuluje, iż nieprawidłowe białko nie tylko nabiera toksycznych właściwości [90], ale także wpływa na konformację prawidłowych kopii białka i ich konwersji do „toksycznych” struktur (*seeding reaction*) [91]. Mechanizm ten tłumaczy pewne opóźnienie w pojawieniu się pierwszych objawów choroby, a później gwałtowne przyspieszenie przebiegu, przypominające namnażanie prionów.

Sprawcze mutacje wprowadzające kodon stop zostały wcześniej zidentyfikowane w genie *SOD1*, ale głównie w eksonie 5. Skrócone formy białka mają krótki czas trwania (*life-time*) i skłonność do tworzenia agregatów [92]. W przypadku mutacji *SOD1 W32X* pozostaje pytanie wymagające dalszych badań funkcjonalnych: czy tak krótka cząsteczka może być przyczyną zjawiska rozsiewania (*seeding reaction*). Badania z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, posiadającym zmutowaną ludzką formę *SOD1* wskazują, że już 36-aminokwasowy peptyd powoduje nieprawidłową agregację nierozpuszczalnej postaci białka *SOD1* w cytoplazmie komórek rdzenia kręgowego, powodując ich śmierć [103]. Z drugiej strony, wciąż nie wykluczona jest hipoteza wpływu utraty funkcji przez białko *SOD1* na rozwój stwardnienia zanikowego bocznego, a prawdopodobnym wydaje się współistnienie tych dwóch patomechanizmów [60]. Mutacje *SOD1 W32X* uznano za prawdopodobnie sprawczą, lecz wymaga ona dalszych badań, zarówno funkcjonalnych, jak i obejmujących identyfikowanie kolejnych pacjentów lub osób zdrowych z tą zmianą, pozwalającą określić jej status.

Analiza *in silico* fenotypowego znaczenia mutacji poprzez zastosowanie wielu różnych modeli i algorytmów jest o tyle istotna, że jak wykazały badania opisane przez Moreira i wsp. (2013) jedynie 34,7% mutacji SOD1 zostało określone jako patogenne przez wszystkie testowane programy (SNAP, SNPs&GO, SIFT, PolyPhen-2, nsSNPAnalyzer, PMUT, PhD- SNP) [93]. Zmiany kształtu pętli tworzących płaszczyznę oddziaływania białko-białko w dimerze SOD1, a także potencjału elektrostatycznego na powierzchni białka (przedstawione w części dotyczącej biomodelowania białka SOD1) mogą mieć duże znaczenie przy oddziaływaniach z innymi lub tym samym białkiem. Należy jednakże zaznaczyć, że wykonane analizy *in silico* są uproszczone i mogą służyć jedynie jako wskazanie do dalszych badań nad tymi mutacjami. Analiza wpływu wybranych mutacji SOD1 na strukturę i właściwości białka wskazuje na możliwość patogenności mutacji zidentyfikowanych w populacji polskiej, co jest szczególnie istotne w przypadku mutacji nowych (np. K3E).

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy analizowano jedynie sekwencje nukleotydowe genów opisanych w literaturze jako najczęściej związane z patogenezą chorób. W przypadku FTD były to *MAPT*, *PGRN* i *C9ORF72*, a ALS – *SOD1* i *C9ORF72*. Pozostałe geny, które są identyfikowane z niską częstością (często jedynie w pojedynczych rodzinach), w przebadanych populacjach zostały pominięte. Wydaje się, że w momencie wykonywania badań ich analiza byłaby nieuzasadniona. W związku z liczbą badań i uzyskiwanych wyników prowadzonych przez liczne zespoły na świecie przebadanie wszystkich, a nawet tylko większości genów prawdopodobnie lub na pewno związanych z opisywanymi chorobami, wymagałoby niewspółmiernego do spodziewanych wyników budżetu i wkładu pracy. Jednak uzyskane wyniki sugerują potrzebę szukania innych równie częstych genetycznych przyczyn obu chorób w polskiej populacji. Porównując częstotliwość mutacji odpowiedzialnych za FTD (w trzech wymienionych wyżej genach) znanych z danych literaturowych i przedstawionych w rozprawie można stwierdzić, że ich częstotliwość jest dość niska. Mutacje w genie *MAPT* i *PGRN* powodują (każdy osobno) 4-20% wszystkich przypadków FTD i 10-23% rodzinnych przypadków w różnych populacjach [26], natomiast mutacje *C9ORF72* powodują odpowiednio 5–17% i 21-41% (w Polsce powyższe proporcje wyglądają nieco inaczej: dla *MAPT* wynosi odpowiednio 4% i 11%, dla *PGRN* 3% i 5% i *C9ORF72* 4% i 5%). Wyniki te są zgodne z rezultatami uzyskanymi w innych populacjach [35,94,95] i potwierdzają, że częstość

mutacji w trzech genach u pacjentów z FTD jest podobna. Częstość mutacji w genie *MAPT* w polskiej populacji jest wyższa niż w *PGRN*, co jest prawdopodobnie wynikiem zidentyfikowania mutacji P301L w trzech rodzinach. Analiza haplotypu *MAPT* pozwala domniemywać, iż wszyscy mają wspólnego przodka będącego nosicielem mutacji. Ponadto ze względu na niewielki obszar geograficzny wywodzenia się dwóch rodzin, a także to samo nazwisko pojawiające się wśród przodków obu rodzin podejrzenia te są bardzo uzasadnione.

Wśród pacjentów z ALS wyselekcjonowano grupę (n=89) „wyższego ryzyka” posiadania mutacji, opartą w zasadniczym stopniu na intuicji klinicystów. Głównym elementem selekcji był niski wiek zachorowania i rodzinność. W tej grupie analizowano pełną sekwencję kodującą (wszystkie eksony wraz z sekwencjami flankującymi) *SOD1*. Mutację zidentyfikowano u 12 pacjentów, co stanowi 14% badanej grupy. W grupie pacjentów z rodzinną historią choroby (n=17) mutacje w *SOD1* odpowiadały za 47%, a *C9ORF72* 12% przypadków. Ponadto w genie *C9ORF72* zidentyfikowano mutacje u kolejnych trojga chorych. Częstość mutacji w genie *SOD1* u pacjentów z Polski podobna jest więc do częstości występowania w innych populacjach. Natomiast określono niską częstość (4%) identyfikacji mutacji w *C9ORF72* w grupie polskich pacjentów z ALS (n=396), w większości populacji uważanej za główną przyczynę ALS. Nie wpływa to na zmniejszenie wiarygodności otrzymanych wyników, gdyż zaobserwowano znaczne różnice w częstości występowania opisywanej mutacji w populacjach europejskich [96,97], a np. w populacjach azjatyckich nie jest praktycznie wykrywana (0% - 1,5%) [98,99,100]. Przeprowadzona analiza haplotypu w otoczeniu *C9ORF72* związanego z ekspansją w pięciu zachodnioeuropejskich populacjach pozwala podejrzewać efekt założyciela związany z tą mutacją [96]. Tłumaczyłoby to znaczne różnice w występowaniu mutacji w różnych populacjach, a także zmniejszanie się częstości wraz z oddalaniem się (nie koniecznie w sensie czysto geograficznym) od „założyciela”, który, według jednej z hipotez, mógł być wikingiem [101].

Mutacje w *C9ORF72* zidentyfikowano w sumie u 22 pacjentów: 17 z ALS, 4 z FTD i 1 z FTD-ALS. Można stwierdzić, że znaczne zwiększenie liczby powtórzeń GGGGCC w *C9ORF72* może prowadzić do rozwoju szerokiego spektrum od FTD poprzez formę pośrednią FTD-ALS do ALS, także w populacji polskiej.

Nie opublikowano dotychczas danych, wskazujących by rozwój poszczególnych postaci choroby czy wiek zachorowania uzależniony był od liczby powtórzeń (oszacowanie liczby powtórzeń bezsprzecznie patogennych możliwe jest z zastosowaniem analizy metodą Southern). Analiza częstości liczby powtórzeń w zakresie niepatogennym (<50x) u pacjentów z FTD, ALS i w grupie kontrolnej nie wykazała wpływu alleli "krótkich" na rozwój chorób, co pokrywa się z wynikami innych grup badaczy [102]. Być może jest tak, że po przekroczeniu pewnej granicznej liczby powtórzeń sekwencji heksanukleotydowej pojawiają się objawy kliniczne od razu z pełną prezentacją kliniczną, a zatem można traktować wspomnianą mutację jako pojedynczą, a nie zespół alleli wielokrotnych. Alternatywnie, zależności pomiędzy długością sekwencji powtarzalnej, a np. ciężkością objawów mogłyby przejawiać się dopiero po przekroczeniu „patogennej” liczby powtórzeń. Opisano natomiast zależność pomiędzy „normalną” długością wspomnianej sekwencji a chorobą Parkinsona [103], ale badania te powinny być powtórzone w innych populacjach. Nie wykryto ekspansji powtórzeń u pacjentów z PD [104] lub wykryto ją w pojedynczych przypadkach PD u pacjentów najczęściej mających w rodzinie chorych na ALS lub FTD [105].

Jak wspomniano oprócz identyfikowania mutacji sprawczych prowadzone są również badania asocjacyjne mające na celu identyfikację statystycznych czynników ryzyka zachorowania. Wiadomo, że genetyczne czynniki ryzyka mogą w istotny sposób wpływać na przebieg choroby. U pacjentów z fenotypem ALS i FTD przebadano dwa polimorfizmy genu *PGRN* (rs850713 i rs5848).

Polimorfizm rs5848 położony jest na nie ulegającym translacji końcu 3' *PGRN*, w miejscu przyłączenia cząsteczki mikroRNA (miR-659), można zatem oczekiwać funkcjonalnego znaczenia rs5848. Istotnie, analiza asocjacji u pacjentów z patologicznie potwierdzonym zwyrodnieniem czołowo-skroniowym z wtrętami ubikwitynowymi (FTLD-U) wykazała, że genotyp TT zwiększał 3,2x ryzyko zachorowania na FTD [106]. Badania *in vitro* potwierdzają wpływ allelu T na hamowanie translacji genu [107], a badania *in vivo* wpływ na poziom *PGRN* w osoczu [108], co jest spójne z hipotezą, iż spadek liczby kopii genu (białka) *PGRN* może być przyczyną FTD. Odnotowano także związek wspomnianego polimorfizmu z innymi chorobami neurodegeneracyjnymi: chorobą Alzheimera [109,110] i chorobą Parkinsona [111]. W badaniu w polskiej populacji nie stwierdzono związku tego polimorfizmu z ALS, zaobserwowano jedynie bardzo słaby ochronny wpływ ($p=0,078$) genotypu TT wobec

FTD. Przyczyną różnic może być fakt, iż analizowano jedynie DNA uzyskane od pacjentów z potwierdzoną neuropatologicznie diagnozą FTL-D-U, podczas gdy w badaniu polskiej populacji znajdują się wszystkie podtypy w nieznanej proporcji, zaś grupa badana nie jest wystarczająco duża. Wyniki uzyskane w innych populacjach europejskich również nie potwierdziły związku polimorfizmu rs5848 ani z FTD [112,113], ani z PD [114].

Polimorfizm rs850713 jest intronowym wariantem genu *PGRN* (IVS4 24G>A) i znajduje się w całkowitej nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem rs67679017 (IVS3-47_-46insGTCA) ($D'=1$) u pacjentów z FTD w populacji polskiej. Wyniki badań zmienności *PGRN* u pacjentów z ALS w populacji belgijskiej i holenderskiej wykazały wpływ polimorfizmu rs850713 na przebieg choroby. W badaniu tym nie stwierdzono różnic w częstości występowania alleli czy genotypów między pacjentami z ALS a osobami zdrowymi. Zaobserwowano jednak zależność między częstszym allelem a późniejszym wiekiem zachorowania, co sugeruje modyfikującą rolę *PGRN* w przebiegu ALS. W populacji holenderskiej polimorfizm IVS3-47-46insGTCA był również związany z krótszym czasem przeżycia od momentu zachorowania [38]. Analiza asocjacji opisana w niniejszej rozprawie, w populacji polskiej, wykazała istotny statystycznie związek rzadszego genotypu AA ($p=0,032$) z niższym ryzykiem zachorowania na FTD. Do chwili obecnej nie opisano bezpośredniego wpływu obu polimorfizmów na białko *PGRN*, także bardziej prawdopodobnym jest fakt, iż wspomniane polimorfizmy (haplotyp) są jedynie markerem zmiany wpływającej na fenotyp, z którą jest sprzężony. Nie są znane wyniki badań asocjacyjnych tego polimorfizmu u pacjentów z FTD w innych populacjach. Wyniki sugerują, że nie tylko mutacje, ale też powszechne warianty genetyczne w obrębie genu *PGRN* mają wpływ na rozwój i przebieg obu chorób. Jednak badania powinny być powtórzone w innych populacjach, wskazane byłoby również zwiększenie liczby pacjentów włączonych do badania.

Mimo że mutacje w analizowanych genach odpowiadają za znaczny procent przypadków FTD (11%) i ALS (18%), do pełniejszego obrazu wskazane jest poszukiwanie zmian w innych znanych genach, a stosunkowo rzadkich w innych populacjach. Postęp dokonany w technikach poznawania sekwencji nukleotydowych, zwłaszcza technik NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*) pozwala na badanie większego panelu genów, całego eksomu, czy nawet całego genomu stosunkowo

szybko i małym kosztem. Badania takie nastroczą jednak kolejnych niedogodności związanych z interpretacją ogromnej ilości danych, a także nie pozwalają wykryć wszystkich czynników genetycznych, jak choćby opisanego *C9ORF72*. Są jednak konieczne do poznania czynników i mechanizmów wpływających na rozwój opisywanych chorób, a także do wskazywania nowych kierunków w poszukiwaniach skutecznej terapii czy w zapobieganiu rozwojowi wspomnianych schorzeń.

6 WNIOSKI

Badania wykonane w ramach rozprawy wykazały istnienie genetycznych czynników patogennych dla stwardnienia zanikowego bocznego i otępienia czołowo-skroniowego w populacji polskiej.

W rezultacie badań ustalono, że:

- mutacje w trzech genach (*PGRN*, *MAPT* i *C9ORF72*) zidentyfikowano w 11% wszystkich przypadków FTD i 31% przypadków rodzinnych,
- mutacje w dwóch genach (*SOD1* i *C9ORF72*) zidentyfikowano w ok. 17% zachorowań na ALS wśród pacjentów z rodzinną postacią i wczesnym zachorowaniem,
- ekspansję heksanukleotydowego motywu (GGGGCC) *C9ORF72* powyżej pięćdziesięciu powtórzeń zidentyfikowano w 4.3% przypadków ALS oraz 3.6% FTD
- liczba powtórzeń *C9ORF72* będących w zakresie niepatologicznym (<25) nie ma wpływu na rozwój obu chorób,
- istnieje związek genotypu AA polimorfizmu rs850713 *PGRN* z niższym ryzykiem FTD,
- polimorfizm rs5848 nie odgrywa znaczącej roli w ryzyku zachorowania na FTD i ALS w populacji polskiej.

7 STRESZCZENIE

Badania nad genetyką różnych chorób neurodegeneracyjnych mogą wytłumaczyć nie tylko nakładanie się objawów w różnych jednostkach chorobowych, ale także wyjaśnić wspólne podłoże genetyczne chorób dotyczących różnych obszarów układu nerwowego i bardzo różniących się fenotypowo np. stwardnienie zanikowe boczne (ALS) oraz otępienie czołowo-skroniowe (FTD). Otępienie czołowo-skroniowe należy do otępień neurodegeneracyjnych, charakteryzujących się klinicznie zaburzeniami poznawczymi i funkcjonalnymi, wynikającymi z postępującego uszkodzenia komórek nerwowych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. Stwardnienie zanikowe boczne to choroba nerwowo-mięśniowa charakteryzująca się neruogennym zanikiem mięśni. ALS charakteryzuje się postępującym i wybiórczym uszkodzeniem neuronów ruchowych rogów przednich rdzenia, pnia mózgu i kory ruchowej. Obecnie przyjmuje się, że ALS i FTD są chorobami o nakładających się cechach klinicznych, patologicznych, ale także o wspólnych przyczynach genetycznych. Sugeruje to, że mogą mieć wspólny neurodegeneracyjny patomechanizm, a co za tym idzie, mogą być częścią jednej choroby o szerokim spektrum objawów.

Do chwili obecnej zidentyfikowano siedem genów, których mutacje są przyczynowo związane z FTD, z czego mutacje trzech genów (*MAPT*, *PGRN* i *C9ORF72*) są najczęstszą genetyczną przyczyną FTD. Spośród ponad 20 genów (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>) związanych głównie z rodzinną postacią ALS, najczęściej identyfikuje się mutacje w czterech: *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*. Opisano liczne rodziny z FTD/ALS o dziedziczeniu autosomalnie dominującym, prezentujące patologię TDP-43. Ich główną przyczyną jest ekspansja heksanukleotydowych powtórzeń w *C9ORF72*, będąca głównym wspólnym genetycznym czynnikiem obu schorzeń, a także również ALS-FTD.

Celem pracy było określenie podłoża genetycznego (mutacji sprawczych) u chorych z rozpoznaniem ALS, FTD i z fenotypami pokrewnymi, oszacowanie częstości występowania mutacji związanych przyczynowo z ALS, FTD i fenotypami pokrewnymi w populacji polskiej. Ocena znaczenia fenotypowego wariantów sekwencji DNA zidentyfikowanych po raz pierwszy w badanych grupach.

Badania prowadzono w grupie chorych z prawdopodobnym rozpoznaniem otępienia czołowo-skroniowego (n=138). Grupa ALS obejmowała 396 niespokrewnionych ze sobą pacjentów. Grupę kontrolną stanowiło 257 zdrowych osób. Analizowano sekwencje nukleotydowe genów *PGRN* i *MAPT* u pacjentów z FTD i *SOD1* u pacjentów z ALS. W obu grupach analizowano heksanukleotydowe powtórzenia (GGGGCC)_n w pierwszym intronie *C9ORF72*. Analizowano możliwe znaczenia fenotypowego dwóch wybranych polimorfizmów (rs5848 i rs850713) genu *PGRN* w FTD i ALS.

W badanej grupie pacjentów z prawdopodobnym rozpoznaniem FTD (n=138) zidentyfikowano 15 mutacji: 6 w *MAPT*, 4 w *PGRN* i 5 w *C9ORF72*. Zidentyfikowano trzy nowe, nieopisane wcześniej mutacje: *MAPT* G55R, *PGRN* D317fsX11, *PGRN* P439_R440fsX6. Mutacje w trzech genach (*PGRN*, *MAPT* i *C9ORF72*) odpowiadają za 11% wszystkich przypadków FTD i 31% przypadków rodzinnych. Wśród pacjentów z ALS u 12 osób zidentyfikowano mutacje w *SOD1* i u 17 w *C9ORF72*. Zidentyfikowano dwie nowe, nieopisane wcześniej mutacje *SOD1* K3E i *SOD1* W32X. Mutacje w dwóch genach (*SOD1* i *C9ORF72*) odpowiadają za ok. 18% zachorowań na ALS wśród pacjentów z rodzinną postacią i wczesnym zachorowaniem. Istnieje związek genotypu AA polimorfizmu rs850713 *PGRN* z niższym ryzykiem FTD, polimorfizm rs5848 nie odgrywa znaczącej roli w ryzyku zachorowania na FTD i ALS w populacji polskiej.

Mimo że mutacje w analizowanych genach odpowiadają za znaczny procent przypadków FTD (11%) i ALS (17%), do pełniejszego obrazu wskazane jest poszukiwanie zmian w innych znanych genach, a stosunkowo rzadkich w innych populacjach. Wydaje się wskazane zastosowanie technik NGS (*Next-Generation Sequencing*), które pozwalają na badanie większego panelu genów, całego eksomu, czy nawet całego genomu stosunkowo szybko i małym kosztem.

8 ABSTRACT

The identification of the causative genes for hereditary neurodegenerative diseases has accelerated studies on the pathophysiological pathways and the development of disease. Identifying common genetic causes suggest similar pathophysiological mechanism with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). FTD is neurodegenerative disorder characterized by behavioral disturbances, language impairment and deficits in executive function caused by progressive neuronal loss predominantly involving the frontal and/or temporal lobes. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common of motor neuron disease characterized by progressive neurodegeneration of motoneurons in the brain and spinal cord. Based on clinical, genetic and epidemiological data it is thought that ALS and FTD, represent an overlapping continuum of disease.

Among the seven genes known to be linked with FTD the most common genetic cause are mutations of *MAPT*, *PGRN* and *C9ORF72*. To date more than 20 genes have been discovered to be associated with ALS, but most common causes of ALS are mutation in *C9ORF2*, *SOD1*, *TARDPB*, *FUS*. Pathological presence of TDP-43 positive inclusions throughout the central nervous system in ALS and FTD patients is mainly due to expansion of hexanucleotide repeat in *C9ORF72*. A hexanucleotide GGGGCC repeat expansion in the noncoding region of the *C9ORF72* gene is the most common genetic abnormality in ALS and frontotemporal dementia FTD.

The aim of the study was to establish genetic backgrounds and frequencies of mutation causing FTD and ALS in the Polish population and to investigate possible correlation between genotypes and phenotypes. The identification of novel mutations and/or atypical genotype-phenotype correlations contributes to further characterizing the disorders.

The study group comprised 138 FTD patients, 395 ALS patients and the control group consisted of 257 healthy persons. *MAPT*, *PGRN* in FTD patients and *SOD1* in ALS patients were analyzed by direct sequencing. *C9ORF72* repeat expansion was analyzed by repeat-primed PCR in FTD and ALS patients. To investigate association between

the variants of the PGRN gene, and ALS and FTD phenotypes two polymorphisms rs850713 and rs5848 were genotyped.

In a group of FTD patients fifteen presumed pathogenic mutations (six MAPT, four PGRN and five C9ORF72) were identified including three novel mutations: MAPT G55R, PGRN D317fsX11, PGRN P439_R440fsX6. Mutations in three analyzed genes are responsible for 11% of all FTD and 31% of familial cases in Polish population. Analysis of two genes in ALS patients revealed twelve patients with mutation in SOD1 and seventeen in C9ORF72. The two of SOD1 mutations (K3E and W32X) were novel. Mutations in analyzed genes are identified in 18% ALS cases with familial history or early-onset of disease. Genotype AA of polymorphism rs850713 of the PGRN gene genotype is associated with a decreased risk of FTD. Variation at PGRN rs5848 is not associated with a risk of FTD and ALS in Polish population.

Although the mutations in the analyzed genes are responsible for a significant percentage of cases FTD (11%) and ALS (17%), it is recommended to search for mutations in other known genes, that are relatively rare in other populations. It seems reasonable to apply NGS (Next Generation Sequencing) that allow the study of the gene panels, exome, or whole genome relatively quickly and affordably.

9 SPIS RYCIN

Ryc. 1 Schematyczna prezentacja sześciu izoform białka MAPT wykrywanych w mózgach ludzkich.	19
Ryc. 2 Struktura C9ORF72 i trzech wariantów transkryptu powstających wskutek alternatywnego składania.	22
Ryc. 3 Procentowy udział pacjentów z poszczególnym rozpoznaniem w badanej grupie pacjentów (FTD).....	31
Ryc. 4 Rozmieszczenie analizowanych polimorfizmów w otoczeniu genu SOD1.....	37
Ryc. 5 Mutacje w grupie rodzinnego FTD.	41
Ryc. 6 Mutacje w przypadkach rodzinnego FTD (F1).	41
Ryc. 7 Mutacje we wszystkich przypadkach FTD.	41
Ryc. 8 Mutacje u chorych z ostateczną diagnozą FTD (F1.).....	41
Ryc. 9 Analiza stopnia zmienności sekwencji białka tau w ewolucji.	44
Ryc. 10 Elektroforegram przedstawiający mutację g. 2402_2403delAC.....	48
Ryc. 11 Elektroforegram przedstawiający heterozygotyczną mutację g.2988_2989delCA genu PGRN.	49
Ryc. 12 Wynik amplifikacji PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych do mutacji (g.2988_2989delCA)	49
Ryc. 13 Przykładowy wynik analizy elektroforetycznej C9ORF72.....	50
Ryc. 14 Mutacje w grupie ALS (n=89).	51

Ryc. 15 Rozkład potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej dimeru SOD1 WT oraz mutantu K3E.....	55
Ryc. 16 Mutant C111Y SOD1.....	57
Ryc. 17 Częstości występowania alleli o różnej długości w grupie kontrolnej.....	58
Ryc. 18 Częstości występowania alleli „dłuższych” w grupie kontrolnej.....	59
Ryc. 19 Częstości występowania alleli różnej wielkości w poszczególnych grupach badanych.....	60
Ryc. 20 Częstości występowania alleli („dłuższych”) różnej wielkości w poszczególnych grupach badanych.	60

10 SPIS TABEL

Tabela 1. Podział FTD pod względem histopatologicznym	18
Tabela 2. Charakterystyka grupy FTD.	31
Tabela 3. Numery sekwencji referencyjnych.	32
Tabela 4. Zidentyfikowane mutacje u pacjentów z FTD.....	40
Tabela 5. Polimorfizmy w genie MAPT zidentyfikowane w badanej grupie FTD.....	42
Tabela 6. Mutacje genu MAPT zidentyfikowane u pacjentów z grupy FTD.....	43
Tabela 7. Polimorfizmy PGRN zidentyfikowane u pacjentów z grupy FTD.....	46
Tabela 8. Mutacje PGRN u pacjentów z FTD.....	47
Tabela 9. Mutacje SOD1 u pacjentów z ALS.....	51
Tabela 10. Allele powiązane z mutacją K3E u polskich i japońskich nosicieli mutacji.	53
Tabela 11. Allele związane z mutacją G41S w polskiej rodzinie i rodzinach włoskich.	54
Tabela 12. Zestawienie częstości genotypów i alleli rs5848 (g.42430244C>T) PGRN w grupach FTD i ALS w porównaniu z grupą kontrolną..	62
Tabela 13. Zestawienie częstości haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs850713 i rs5848 PGRN w grupach FTD i ALS w porównaniu z grupą kontrolną.....	63

11 SUPLEMENT

Tabela S 1. Startery do PCR oraz PCR sekwencyjnych *PGRN*

Starter	Sekwencja startera (5' → 3')	Ekson	Wielkość amplikonu (pz)
GRN-1F GRN-1R	GGGCTAGGGTACTGAGTGAC AGTGTTGTGGGCCATTTG	1	368
GRN-2F GRN-2R	TGCCCAGATGGTCAGTTC GCTGCACCTGATCTTTGG	2	537
GRN-3F GRN-3R	GGCCACTCCTGCATCTTTAC TGAATGAGGGCACAAGGG	3	369
GRN-45F GRN-45R	TTAGTGTACCCCTCAAACC ACTGGAAGAGGAGCAAAC	4 i 5	587
GRN-6F GRN-6R	GGGCCTCATTGACTCCAAGTGTA GGTCTTTGTCACTTCCAGGCTCA	6	401
GRN-7F GRN-7R	TCCCTGTGTGCTACTGAG AAGCAGAGAGGACAGGTC	7	373
GRN-8F GRN-8R	TACCCTCCATCTTCAACAC TCACAGCACACAGCCTAG	8	309
GRN-9F GRN-9R	ATACCTGCTGCCGTCTAC GAGGGCAGAAAGCAATAG	9	457
GRN-10F GRN-10R	TGTCCAATCCCAGAGGTATATG ACGTTGCAGGTGTAGCCAG	10	616
GRN-11F GRN-11R	TGGACTGGAGAAGATGCC CGATCAGCACAACAGACG	11	574
GRN-12F GRN-12R	CATGATAACCAGACCTGC AGGGAGAATTTGGTTAGG	12	387

Tabela S 2. Warunki PCR do amplifikacji wszystkich eksonów *PGRN*

Warunki reakcji dla par starterów:		GRN-1F i GRN-45R GRN-45F i GRN-8R GRN-8F i GRN-12R	
Etapy:		T [°C]	Czas
Denaturacja wstępna		94°C	2 min 30s
Amplifikacja sekwencji (15 cykli)	Denaturacja	94°C	15 s
	przyłączanie starterów	58°C – 0,1°C na cykl	15 s
	synteza nici komplementarnej	72°C	1 min
Amplifikacja sekwencji (20 cykli)	denaturacja	94°C	15 s
	przyłączanie starterów	58°C – 0,1°C na cykl	15 s
	synteza nici komplementarnej	72°C	1 min 30 s
Końcowa elongacja		72°C	7 min

Tabela S 3. Warunki PCR do amplifikacji wszystkich eksonów *MAPT*

Etapy:		T [°C]	Czas
Denaturacja wstępna		94°C	2 min
Amplifikacja sekwencji (33 cykli)	denaturacja	94°C	15 s
	przyłączanie starterów	58°C *	15 s
	synteza nici komplementarnej	72°C	45 sec
Końcowa elongacja		72°C	5 min

*Inne temperatury przyłączenia starterów dla par starterów do amplifikacji eksonów: 9 - 59°C, 13 - 54°C

Tabela S 4. Startery do PCR oraz PCR sekwencyjnego *MAPT*

Starter	Sekwencja startera (5' → 3')	Ekson	Wielkość amplikonu (pz)
Mapt-1F Mapt-1R	CCCCAACACTCCTCAGAACTTATC CACCGTGTCTGGCCATTATCTCA	1	383
Mapt-2F Mapt-2R	CACAGGGAGCGATTTTCAGC CCACGCTGTCCTGCAAAGC	2	338
Mapt-3F Mapt-3R	GGGCTGCTTTCTGGCATATG CCTCACTTCTGTACAGGTC	3	297
Mapt-4F Mapt-4R	GGTGCTGTGCCTTTTGTTTAGTGA ATGCCTTAGGAATTACCCAGAA	4	491
Mapt-5F Mapt-5R	TCCACCAGACCCAACTAAACAAAC AAAAGCCTGCCCAAATAACAAAG	5	331
Mapt-6F Mapt-6R	TTCAACCATTACCTGCCTTATTTA CTATTTTACACGGTGCTTCTATGC	6	440
Mapt-7F Mapt-7R	GTGGGGCTGGTGTGACTCTTG CAGCTGCCAGGGGTTATTCATTCT	7	312
Mapt-8F Mapt-8R	GCCCTGTTTAAGCCTGATGAT TCCTCCCGGCTCTAGAAACACAAG	8	190
Mapt-9F Mapt-9R	GAGCGGGTATTGGATGGTGGTTGA AGAGGGGACTGGGGTGTTATG	9	704
Mapt-10F Mapt-10R	GCAGCCCTCTATCCCTTCAGC GTACGCACTCACACCACTTCCTAA	10	378
Mapt-11F Mapt-11R	AGGGCCTGGGCTTACACA TGCCTGCCTTATTTCACTTCACT	11	461
Mapt-12F Mapt-12R	TGGCCCTGGTTCAAGTCCT GCCACATCCAGCCAGTCAAC	12	451
Mapt-13F Mapt-13R	AGTTGGCAGGGCTGGTCTTTC GGGGGCCGGGTCATTATTC	13	362

Tabela S 5. Startery do PCR oraz PCR sekwencyjnego *SOD1*

Starter	Sekwencja startera (5'→3')	Ekson	Wielkość ampikonu (pz)
SOD1-1f SOD1-1r	GAAGGTTGTTTTCTCCACATTTTCG GACCCGCTCCTAGCAAAGGT	1	463
SOD1-2f SOD1-2r	TTTTCCACTCCCAAGTCTGG GGGAGGTCAAGGCTAAGGTC	2	388
SOD1-3f SOD1-3r	AAGGTGTTGCTTATCCCAGAAGTC CAATTCCTTTAAGCCCAGGAAGTA	3	392
SOD1-4f SOD1-4r	CGTGAAGCCTTGTTTGAAGA GAAACCGCGACTAACAATCAA	4	354
SOD1-5f SOD1-5r	GGGTATTGTTGGGAGGAGGT TCTGTTCCACTGAAGCTGTTT	5	572

Tabela S 6. Warunki PCR do amplifikacji wszystkich eksonów genu *SOD1*

Etapy:		T [°C]	Czas
Denaturacja wstępna		94°C	2 min
Amplifikacja sekwencji (33 cykli)	denaturacja	94°C	15 s
	przyłączenie starterów	58°C	15 s
	Synteza nici komplementarnej	72°C	45 sec
Końcowa elongacja		72°C	7 min

Tabela S7. Startery do analizy haplotypu *MAPT*

Polimorfizm	Starter	Sekwencja startera (5'→3')
rs2471738	H1-F H1-R	CTTTTCCTGCTCAGGCATGT GAACCGAATGAGGACTGGAA
rs1467967	H1a-f H1a-r	AGGGTACTTTCATGGCGTTG AGGCTGAAATGATCCCTCTG
rs7521	H1b-f H1b-r	ACCTCTGTGCCACCTCTCAC AGGTGAGGCTCTAGGCCAGT
rs242557	MAPh-14F MAPh-14r	GAACATGCACATTTCTGCAAC AATGCTGGGAAGCAAAAGAA
rs3785883	MAPh-17F MAPh-17r	CATTGCCATCACCTTGTCAG AGTTTCCTGGAAGCCATGTG
Startery deleccji	do H1h2F H1h2R	GGAAGACGTTCTCACTGATCTG AGGAGTCTGGCTTCAGTCTCTC

Tabela S8. Startery do analizy genotypu *C9ORF72*

	Stater	Sekwencja startera (5'→3')
Genotypowa nie	C9orf72 F C9orf72 R	FAM-CAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC GCAGGCACCGCAACCGCAG
Repeat primed PCR	MRX-F	FAM- TGTAACGACGGCCAGTCAAGGAGGGAA ACAACCGCAGCC
	MRX-M13R	CAGGAAACAGCTATGACC
	MRX-R1	CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCCC GACCACGCCCCGGCCCCGGCCCCGG

Tabela S 9. Startery do genotypowania *SOD1*

Starter	Sekwencja startera (5'→3')	Wielkość amplikonu (pz)
D21S263F	TTGGCTTTGGAACCA CATCAGCAAGGGTCCTC	170-190
Hamlet	GAAGTGGCTTCACCTGTGA CAAGCTATATGTGCTTGCTG	140-160
Macbeth	GTGGACCTACAGAAACCCTG GCTGTACTGAGATTATCAAAGG	220-240
Shylock	GATTGCGCCACTGCACT TGGAATGTATTCATTCTACTGCAC	127-140
Yorick	CTGGGCAACAAAGCAAGACT TACCCTCTGATGCGGAAATC	130-160
Goneril	TTGGGAAACTGCTGCC CCTGGGCAATGAGAGTGAA	170-180
D21S223	GAAAGAAGCACAGAGGGGT CTCACTCACATTTAACTTGGG	80-90
D21S63	TCATGACGAGCACAGTAGAGT CAGGATTATTTAGGCTAGAAC	90-106

Tabela S 10. Mieszanina reakcyjna do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli z zastosowaniem zestawu sond TaqMan i starterów (TaqMan SNP Genotyping Assay) dla polimorfizmów w genie rs850713 i rs5848 PGRN.

Skład mieszaniny	Objętość
TaqMan Universal PCR Master Mix	2,5 µl
20X TaqMan SNP Genotyping assay Mix	0,125 µl
Genomowe DNA	5-20ng/µl
H2O	Uzupełniano do 10 µl

Tabela S 11. Zestawienie stosowanych sond do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli polimorfizmów rs850713 i rs5848 genu *PGRN*. W sekwencji sondy w nawiasie kwadratowym zaznaczono badany polimorfizm. Pierwszy allel jest znakowany fluorochromem VIC, drugi - FAM.

Polimorfizm	Zestaw sond i starterów	Sonda [VIC/FAM]
rs850713	C__254824 6_10	AGGTACAAATCTGGGGGAGATGGGG[A/G]TATGTGGAGGGA AGTGGGGCAGAG
rs5848	C__745204 6_20	TCTGCTCAGGCCTCCCTAGCACCTC[C/T]CCCTAACCAATTC TCCCTGGACCC

12 PIŚMIENICTWO

- 1 Brown R.C., Lockwood A.H., Sonawane B.R.: Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(9): 1250–1256.
- 2 Rhinn H., Fujita R., Qiang L., Cheng R., Lee J.H., Abeliovich A.: Integrative genomics identifies APOE ε4 effectors in Alzheimer's disease. *Nature.* 2013; 500(7460):45-50.
- 3 Zuo L., van Dyck C.H., Luo X., Kranzler H.R., Yang B.Z., Gelernter J.: Variation at APOE and STH loci and Alzheimer's disease. *Behav Brain Funct.* 2006; 2:13.
- 4 van Heyningen V., Yeyati P.L.: Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease. *Human Molecular Genetics*, 2004; Vol. 13, Review Issue 2.
- 5 Richards C.S., Bale S., Bellissimo D.B., Das S., Grody W.W., Hegde M.R. et al.: ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: revisions 2007. *Genet Med* 2008; 10:294–300.
- 6 Woolley J.D., Khan B.K., Murthy N.K., Miller B.L., Rankin K.P.: The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease; rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *J Clin Psychiatry.* 2011; 72(2): 126–133.
- 7 Rossor M.N., Fox N.C., Mummery C.J., Schott J.M, Warren J.D.: The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol.* 2010; 9(8): 793–806.
- 8 Cardarelli R, Kertesz A, Knebl JA.: Frontotemporal dementia: a review for primary care physicians. *Am Fam Physician.* 2010; 82(11):1372-7.
- 9 Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S et al.: Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546-1554.
- 10 Rascovsky K., Hodges J.R., Knopman D., Mendez M.F., Kramer J.H., Neuhaus J., et al.: Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia *Brain* 2011; 134: 2456-77.

-
- 11 Johnson J.K., Diehl J., Mendez M.F., Neuhaus J., Shapira J.S., Forman M. et al.: Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Arch Neurol* 2005; 62:925–30.
 - 12 Onyike C.U., Diehl-Schmid J.: The epidemiology of frontotemporal dementia. *Int Rev Psychiatry*. 2013; 25(2):130-7.
 - 13 Rosso S.M., Donker Kaat L., Baks T., Joosse M., de Koning I., Pijnenburg Y. et al.: Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*. 2003; 126(Pt 9):2016-22.
 - 14 Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., Hodges J.R.: The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, 58 (2002), pp. 1615–1621.
 - 15 Pressman P.S., Miller B.L.: Diagnosis and Management of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia. *Biol Psychiatry*. 2014; 75(7):574-581.
 - 16 Seeley W.W., Crawford R., Rascofsky K., Kramer J.H., Weiner M., Miller B.L., et al.: Frontal paralimbic network atrophy in very mild behavioral variant frontotemporal dementia. *Arch Neurol*. 2008; 65(2):249-55.
 - 17 Pelicano P.J., Massano J.: Clinical, genetic and neuropathological features of frontotemporal dementia: an update and guide. *Acta Med Port*. 2013; 26(4):392-401. Epub 2013 Aug 30.
 - 18 Varma A.R., Adams W., Lloyd J.J., Carson K.J., Snowden J.S., Testa H.J., et al.: Diagnostic patterns of regional atrophy on MRI and regional cerebral blood flow change on SPECT in young onset patients with Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and vascular dementia. *Acta Neurol Scand*. 2002; 105(4):261-9.
 - 19 Seeley W.W., Carlin D.A., Allman J.M., Macedo M.N., Bush C., Miller B.L. et al.: Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Ann Neurol*. 2006; 60(6):660-7.
 - 20 McKhann G.M., Albert M.S., Grossman M., Miller B., Dickson D., Trojanowski J.Q.: Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 2001; 58:1803–9.

-
- 21 Neumann M., Rademakers R., Roeber S., Baker M., Kretzschmar H.A., Mackenzie I.R.: A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain*. 2009; 132(Pt 11):2922-31.
 - 22 See T.M., LaMarre A.K., Lee S.E., Miller B.L.: Genetic causes of frontotemporal degeneration. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010; 23(4):260-8.
 - 23 Loy C.T., Schofield P.R., Turner A.M., Kwok J.B.: Genetics of dementia. *Lancet*. 2014; 383(9919):828-40.
 - 24 Brandt R., Hundelt M., Shahani N.: Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739(2-3):331-54.
 - 25 Cruts M., Theuns J., Van Broeckhoven C.: Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat*. 2012; 33(9):1340-4.
 - 26 Goldman J.S., Rademakers R., Huey E.D., Boxer A.L., Mayeux R., Miller B.L. et al.: An algorithm for genetic testing of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 2011; 76(5):475-83.
 - 27 Masellis M., Momeni P., Meschino W., Heffner R. Jr, Elder J., Sato C. et al.: Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome. *Brain*. 2006; 129(Pt 11):3115-23.
 - 28 Ward M.E., Miller B.L.: Potential mechanisms of progranulin-deficient FTL. *J Mol Neurosci*. 2011; 45(3):574-82.
 - 29 Shankaran S.S., Capell A., Hruscha A.T., Fellerer K., Neumann M., Schmid B. et al.: Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion. *J Biol Chem*. 2008; 283(3):1744-53.
 - 30 Tapia L., Milnerwood A., Guo A., Mills F., Yoshida E., Vasuta C. et al.: Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses *J Neurosci*, 2011; 31:11126–11132.
 - 31 Miller Z.A., Rankin K.P., Graff-Radford N.R., Takada L.T., Sturm V.E., Cleveland C.M. et al.: TDP-43 frontotemporal lobar degeneration and autoimmune disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(9):956-62.

-
- 32 Baker M., Mackenzie I.R., Pickering-Brown S.M., Gass J., Rademakers R., Lindholm C. et al.: Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006; 442(7105):916-9.
- 33 Gass J., Cannon A., Mackenzie I.R., Boeve B., Baker M., Adamson J. et al.: Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(20):2988-3001.
- 34 Cruts M., Gijssels I., van der Zee J., Engelborghs S., Wils H., Pirici D. et al.: Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006; 442(7105):920-4.
- 35 Borroni B., Archetti S., Alberici A., Agosti C., Gennarelli M., Bigini B. et al.: Progranulin genetic variations in frontotemporal lobar degeneration: evidence for low mutation frequency in an Italian clinical series. *Neurogenetics*. 2008; 9(3):197-205.
- 36 Brouwers N., Sleegers K., Engelborghs S., Maurer-Stroh S., Gijssels I. et al.: Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology*. 2008; 71(9):656-64.
- 37 Schymick J.C., Yang Y., Andersen P.M., Vonsattel J.P., Greenway M., Momeni P. et al.: Progranulin mutations and amyotrophic lateral sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia phenotypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78(7):754-6.
- 38 Sleegers K., Brouwers N., Maurer-Stroh S., van Es M.A., Van Damme P., van Vught P.W. et al.: Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008; 71(4):253-9.
- 39 Farg M.A., Sundaramoorthy V., Sultana J.M., Yang S., Atkinson R.A., Levina V. et al.: C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb 27. [Epub ahead of print]
- 40 Ash P.E., Bieniek K.F., Gendron T.F., Caulfield T., Lin W.L., DeJesus-Hernandez M. et al.: Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 2013; 77:639–646.

-
- 41 Dobson-Stone C., Hallupp M., Loy C.T., Thompson E.M., Haan E., Sue C.M. et al.: C9ORF72 repeat expansion in Australian and Spanish frontotemporal dementia patients. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56899.
- 42 Lomen-Hoerth C.: Clinical phenomenology and neuroimaging correlates in ALS-FTD. *J Mol Neurosci* 2011; 45: 656 – 62.
- 43 Byrne S., Elamin M., Bede P., Shatunov A., Walsh C., Corr B. et al.: Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *Lancet Neurol*. 2012; 11(3):232-40.
- 44 Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simón-Sánchez J., Rollinson S., Gibbs J.R. et al.: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72:257 – 68.
- 45 DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J. et al.: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72:245 – 56.
- 46 Woollacott I.O., Mead S.: The C9ORF72 expansion mutation: gene structure, phenotypic and diagnostic issues. *Acta Neuropathol*. 2014; 127(3):319-32.
- 47 Coon E.A., Daube J.R., DeJesus-Hernandez M., Adeli A., Savica R., Parisi J.E. et al.: Clinical and electrophysiologic variability in amyotrophic lateral sclerosis within a kindred harboring the C9ORF72 repeat expansion. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*, 2013; 14:132–137.
- 48 Synofzik M., Born C., Rominger A., Lummel N., Schöls L., Biskup Set al.: Targeted high-throughput sequencing identifies a TARDBP mutation as a cause of early-onset FTD without motor neuron disease. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(5):1212.e1-5.
- 49 Urwin H., Josephs K.A., Rohrer J.D., Mackenzie I.R., Neumann M., Authier A. et al.: FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathologica* 2010; 120:33–41.
- 50 Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Cleveland D.W.: TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(R1):R46-64.

-
- 51 Huey E.D., Ferrari R., Moreno J.H., Jensen C., Morris C.M., Potocnik Fet al.: FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(5):1016.e9-17.
- 52 Kamińska A.: Stwardnienie zanikowe boczne. W: Hausmanowa-Petrusewicz I. [red.]: *Choroby nerwowo-mięśniowe*. Wyd 2. Polska Akademia Nauk. Wydział Nauk Medycznych. Komitet Nauk Neurologicznych. Lublin 2013, ss 344-360.
- 53 Pasinelli P., Brown R.H.: Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(9):710-23.
- 54 Rafałowska J.: Stwardnienie zanikowe boczne. W: Hausmanowa-Petrusewicz I. [red.]: *Choroby nerwowo-mięśniowe*, Wyd 1, Polska Akademia Nauk. Wydział Nauk Medycznych. Komitet Nauk Neurologicznych. Lublin 2005, ss 334-352.
- 55 Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O.: Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010; 81(4):385-90.
- 56 Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L., World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases : El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis . *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000; 1:293–9.
- 57 Thomsen G.M., Gowing G., Svendsen S., Svendsen C.N.: The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp Neurol*. 2014:S0014-4886(14)00073-9.
- 58 Finsterer J., Burgunder J.M.: Recent progress in the genetics of motor neuron disease. *Eur J Med Genet*. 2014; 57(2-3):103-112.
- 59 Siddique T., Nijhawan D., Hentati A. Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology* 1996, 47 (suppl. 2), S27-S35.
- 60 Saccon R.A., Bunton-Stasyshyn R.K., Fisher E.M., Fratta P.: Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*. 2013; 136:2342-58.
- 61 Strong M.J.: The syndromes of frontotemporal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008; 9(6):323-38.
- 62 Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T. et al.: TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314(5796):130-3.

-
- 63 Fecto F, Siddique T. Making connections: pathology and genetics link amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobe dementia. *J Mol Neurosci.* 2011; 45(3):663-75.
- 64 Achi E.Y., Rudnicki S.A.: ALS and Frontotemporal Dysfunction: A Review. *Neurol Res Int.* 2012;2012:806306.
- 65 Mackenzie I.R.: The neuropathology of FTD associated with ALS. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2007; 21(4):S44-9.
- 66 Borroni B., Bonvicini C., Alberici A., Buratti E., Agosti C., Archetti S. et al.: Mutation within TARDBP leads to Frontotemporal Dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat.* 2009; 30(11):E974-83.
- 67 Abrahams S., Newton J., Niven E., Foley J., Bak T.H.: Screening for cognition and behaviour changes in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014; 15(1-2):9-14
- 68 Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.
- 69 Untergrasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. et al.: Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
- 70 Zekanowski C., Pepłońska B., Styczyńska M., Gustaw K., Kuźnicki J., Barcikowska M.: Mutation screening of the MAPT and STH genes in Polish patients with clinically diagnosed frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2003; 16(3):126-31.
- 71 Sambrook J., Russel D.W.: *Molecular cloning, a laboratory manual.* Wyd. 3. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.
- 72 Parton M.J., Broom W., Andersen P.M., Al-Chalabi A., Leigh N.P. et al.: D90A-SOD1 mediated amyotrophic lateral sclerosis: a single founder for all cases with evidence for a cis-acting disease modifier in the recessive haplotype. *Hum Mutat.* 2002; 20:473.
- 73 Battistini S., Ricci C., Giannini F., Calzavara S., Greco G., Del Corona A. et al.: G41S SOD1 mutation: A common ancestor for six ALS Italian families with an aggressive phenotype. *Amyotroph Lateral Scler.* 2010;11(1-2):210-5.

-
- 74 Livak K.J., Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- 75 Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J.: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21(2):263-5.
- 76 Desmet F.O., Hamroun D., Lalande M., Collod-Beroud G., Claustres M., Beroud C.: Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(9):e67.
- 77 Krieger E., Darden T., Nabuurs S.B., Finkelstein A., Vriend G.: Making optimal use of empirical energy functions: Force-field parameterization in crystal space. *Proteins*. 2004; 57(4):678-683.
- 78 Iyer A., Lapointe N.E., Zielke K., Berdynski M., Guzman E., Barczak A. et al.: A novel MAPT mutation, G55R, in a frontotemporal dementia patient leads to altered Tau function. *PLoS One*. 2013;8(9) e76409
- 79 Sitek E.J., Narozanska E., Barczak A., Jasinska-Myga B., Harciarek M., Chodakowska-Zebrowska M. et al.: Agraphia in patients with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 with P301L MAPT mutation: dysexecutive, aphasic, apraxic or spatial phenomenon? *Neurocase*. 2014; 20(1):69-86.
- 80 Chiang H.H., Rosvall L., Brohede J., Axelman K., Björk B.F., Nennesmo I. et al.: Progranulin mutation causes frontotemporal dementia in the Swedish Karolinska family. *Alzheimer's & Dementia*. 2008; 4: 414-420.
- 81 Skoglund L., Brundin R., Olofsson T., Kalimo H., Ingvast S., Blom E.S. et al.: Frontotemporal dementia in a large Swedish family is caused by a progranulin null mutation. *Neurogenetics*. 2009; 10: 27-34.
- 82 Van Deerlin V.M., Wood E.M., Moore P., Yuan W., Forman M.S., Clark C.M. et al.: Clinical, genetic, and pathologic characteristics of patients with frontotemporal dementia and progranulin mutations. *Archives of Neurology* 2007; 64: 1148-1153.
- 83 Schlachetzki J.C., Schmidtke K., Beckervordersandforth J., Borozdin W., Wilhelm C., Hüll M. et al.: Frequency of progranulin mutations in a German cohort of 79 frontotemporal dementia patients. *Journal of Neurology* 2009; 256: 2043-2051.

-
- 84 Yu C.E., Bird T.D., Bekris L.M., Montine T.J., Leverenz J.B., Steinbart E. et al.: The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. *Archives of Neurology* 2010; 67: 161-170.
- 85 Gabryelewicz T., Masellis M., Berdyski M., Bilbao J.M., Rogaeva E., St George-Hyslop P. et al.: Intra-familial clinical heterogeneity due to FTLD-U with TDP-43 proteinopathy caused by a novel deletion in progranulin gene (PGRN). *J Alzheimers Dis.* 2010; 22(4):1123-33.
- 86 Kuźma-Kozakiewicz M., Berdyński M., Morita M., Takahashi Y., Kawata A., Kaida K. et al.: Recurrent K3E mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013; 14(7-8):608-14.
- 87 Berdyński M., Kuźma-Kozakiewicz M., Ricci C., Kubiszewska J., Millicamps S., Salachas F. et al.: Amyotroph Lateral Scler. 2012 Jan;13(1):132-6. Erratum in: *Amyotroph Lateral Scler.* 2012; 13(4):405.
- 88 Cenik B., Sephton C.F., Dewey C.M., Xian X., Wei S., Yu K. et al.: Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) up-regulates progranulin transcription: Rational therapeutic approach to frontotemporal dementia. *J Biol Chem.* 2011; 286:16101-16108.
- 89 Bruijn L.I., Houseweart M.K., Kato S., Anderson K.L., Anderson S.D., Ohama E. et al.: Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science.* 1998; 281(5384):1851-4.
- 90 Bruijn L.I., Miller T.M., Cleveland D.W.: Review Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 2004; 27:723-49.
- 91 Ogawa M., Furukawa Y.: A seeded propagation of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:83 eCollection 2014.
- 92 Ghadge G.D., Wang L., Sharma K., Monti A.L., Bindokas V., Stevens F.J., Roos R.P.: Truncated wild-type SOD1 and FALS-linked mutant SOD1 cause neural cell death in the chick embryo spinal cord. *Neurobiol Dis.* 2006; 21(1):194-205.

-
- 93 Moreira L.G., Pereira L.C., Drummond P.R., De Mesquita J.F.: Structural and functional analysis of human SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2013; 8(12):e81979.
- 94 Binetti G., Nicosia F., Benussi L., Ghidoni R., Feudatari E., Barbiero L. et al.: Prevalence of TAU mutations in an Italian clinical series of familial frontotemporal patients. *Neurosci Lett*. 2003; 338(1):85-7.
- 95 Wood E.M., Falcone D., Suh E., Irwin D.J., Chen-Plotkin A.S., Lee EB. Et al.: Development and validation of pedigree classification criteria for frontotemporal lobar degeneration. *JAMA Neurol*. 2013; 70(11):1411-7.
- 96 Smith B., Newhouse S., Shatunov A., Vance C., Topp S., Johnson L. et al.: The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *Eur J Hum Genet*. 2013; 21(1):102-8.
- 97 Majounie E., Renton A.E., Mok K., Dopper E.G., Waite A., Rollinson S. et al.: Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012; 11(4):323-30.
- 98 Jiao B., Tang B., Liu X., Yan X., Zhou L., Yang Y. et al.: Identification of C9orf72 repeat expansions in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia in mainland China. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(4):936.e19-22.
- 99 Kim E.J., Kwon J.C., Park K.H., Park K.W., Lee J.H., Choi S.H. et al.: Clinical and genetic analysis of MAPT, GRN, and C9orf72 genes in Korean patients with frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(5):1213.e13-7.
- 100 Alavi A., Nafissi S., Rohani M., Shahidi G., Zamani B., Shamshiri H. et al.: Repeat expansion in C9ORF72 is not a major cause of amyotrophic lateral sclerosis among Iranian patients. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(1):267.e1-7.
- 101 Pliner H.A., Mann D.M., Traynor B.J.: Searching for Grendel: origin and global spread of the C9ORF72 repeat expansion. *Acta Neuropathol*. 2014; 127(3):391-6.
- 102 Rutherford N.J., Heckman M.G., Dejesus-Hernandez M., Baker M.C., Soto-Ortolaza A.I., Rayaprolu S. et al.: Length of normal alleles of C9ORF72 GGGGCC repeat do not influence disease phenotype. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(12):2950.e5-7.

-
- 103 Nuytemans K., Bademci G., Kohli M.M., Beecham G.W., Wang L., Young J.I. Et al.: C9ORF72 intermediate repeat copies are a significant risk factor for Parkinson disease. *Ann Hum Genet.* 2013; 77(5):351-63.
- 104 Nuytemans K., Inchausti V., Beecham G.W., Wang L., Dickson D.W., Trojanowski J.Q. et al.: Absence of C9ORF72 expanded or intermediate repeats in autopsy-confirmed Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014; 29(6):827-30.
- 105 Lesage S., Le Ber I., Condroyer C., Broussole E., Gabelle A., Thobois S. et al.: C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain.* 2013; 136(Pt 2):385-91.
- 106 Rademakers R., Eriksen J.L., Baker M., Robinson T., Ahmed Z., Lincoln S.J. et al.: Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(23):3631-42.
- 107 Rademakers R., Rovelet-Lecrux A.: Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends Neurosci.* 2009 August; 32(8): 451–461.
- 108 Hsiung G.Y., Fok A., Feldman H.H., Rademakers R., Mackenzie I.R.: rs5848 polymorphism and serum progranulin level. *J Neurol Sci.* 2011; 300(1-2):28-32.
- 109 Lee M.J., Chen T.F., Cheng T.W., Chiu M.J.: rs5848 variant of progranulin gene is a risk of Alzheimer's disease in the Taiwanese population. *Neurodegener Dis.* 2011; 8(4):216-20.
- 110 Sheng J., Su L., Xu Z., Chen G.: Progranulin polymorphism rs5848 is associated with increased risk of Alzheimer's disease. *Gene.* 2014; 542(2):141-5.
- 111 Chang K.H., Chen C.M., Chen Y.C., Hsiao Y.C., Huang C.C., Kuo H.C. et al.: Association between GRN rs5848 polymorphism and Parkinson's disease in Taiwanese population. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54448.
- 112 Rollinson S., Rohrer J.D., van der Zee J., Sleegers K., Mead S., Engelborghs S. et al.: No association of PGRN 3'UTR rs5848 in frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging.* 2011;32(4): 754-5.
- 113 Simón-Sánchez J., Seelaar H., Bochdanovits Z., Deeg D.J., van Swieten J.C., Heutink P.: Variation at GRN 3'-UTR rs5848 is not associated with a risk of frontotemporal lobar degeneration in Dutch population. *PLoS One.* 2009; 4(10):e7494.

114 Jasinska-Myga B., Wider C., Opala G., Krygowska-Wajs A., Barcikowska M., Czyzewski K. et al.: GRN 3'UTR+78 C>T is not associated with risk for Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2009; 16(8):909-11.