

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

mgr inż. Aleksandra Maruszak

**Analiza zmienności mitochondrialnego DNA oraz  
wybranych genów jądrowych u osób z chorobą  
Alzheimera**

Rozprawa doktorska

wykonana pod kierunkiem dr hab. Cezarego Żekanowskiego, prof. IMDiK  
w Zespole Kliniczno-Badawczym Chorób Zwyrodnieniowych CUN IMDiK  
PAN

Warszawa, 2011



*Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, dr hab. Cezaremu Żekanowskiemu, prof. IMDiK, za opiekę, pomoc i wsparcie w trakcie realizacji badań zawartych w niniejszej rozprawie.*

*Składam także podziękowania profesor Marii Barcikowskiej za cenne wskazówki i konsultacje oraz opiekę w trakcie realizacji pracy doktorskiej.*

*Serdecznie dziękuję dr hab. Krzysztofowi Safranowowi, prof. PAM, za liczne sugestie statystyczne, nieocenioną pomoc i bezcenną życzliwość.*

*Realizacja opisanych tutaj badań nie byłaby możliwa bez lekarzy i neuropsychologów, którzy brali udział w doborze i ewaluacji grup badanych. Chciałabym szczególnie serdecznie podziękować dr n. med. Marii Styczyńskiej, dr hab. Tomaszowi Gabryelewiczowi, prof. IMDiK, dr n. med. Małgorzacie Chodakowskiej-Żebrowskiej, oraz dr Annie Barczak z IMDiK PAN oraz Poradni Alzheimerowskiej Szpitala MSWiA w Warszawie.*

*Pragnę także podziękować wszystkim chorym i ich rodzinom, a także osobom z grupy kontrolnej za zgodę na udział w badaniach.*

*Chciałabym także podziękować dr Wojciechowi Branickiemu oraz prof. Jeffreyowi A. Canter (USA) za liczne sugestie i zarażenie entuzjazmem do statystyki.*

*Dziękuję także wszystkim obecnym i wcześniejszym członkom naszego zespołu – Beacie, Kasi, Maćkowi, Małgosi, Mariuszowi – za miłą współpracę, owocne dyskusje i pomoc.*

*Dziękuję firmie Novartis Polska za finansowanie stypendium doktoranckiego w latach 2005-2009, Fundacji Nauki Polskiej za stypendium w Programie START oraz firmie L'Oréal Polska za stypendium w konkursie UNESCO-L'Oréal Polska dla Kobiet i nauki*

*Dziękuję mojej Rodzinie za wspieranie moich aspiracji naukowych. Szczególne podziękowania składam Jonasowi- za cierpliwość, zrozumienie dla mojej pasji oraz za bezcenne i wielowymiarowe wsparcie.*



## **Publikacja wyników**

Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w trzech artykułach oryginalnych:

Maruszak A, Canter JA, Styczyńska M, Żekanowski C, Barcikowska M (2009) Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease- is there a connection? *Neurobiol Aging* 30(11):1749-1755.

Maruszak A, Safranow K, Gustaw K, Kijanowska-Haładyna B, Jakubowska K, Olszewska M, Styczyńska M, Berdyński M, Tysarowski A, Chlubek D, Siedlecki J, Barcikowska M, Żekanowski C. (2009) PIN1 gene variants in Alzheimer's disease. *BMC Med Genet* 10:115.

Maruszak A, Safranow K, Branicki W, Gawęda-Walerych K, Pośpiech E, Gabryelewicz T, Canter JA, Barcikowska M, Żekanowski C. The impact of mitochondrial and nuclear DNA variants on late-onset Alzheimer's disease. (wysłane 31.03.11 do redakcji Mitochondrion).

Badania przedstawione w tej rozprawie zostały częściowo sfinansowane ze środków grantu N N401 062235, "Badanie zmienności mitochondrialnego DNA w późnoobjawowej chorobie Alzheimera", Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Kierownik: dr hab. C. Żekanowski, prof. IMDiK, AWF



# SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI .....	1
<b>1 WSTĘP .....</b>	<b>5</b>
1.1 Choroba Alzheimerera .....	5
1.1.1 Wczesna i późna postać choroby Alzheimerera .....	6
1.1.2 Rodzinna postać choroby Alzheimerera .....	6
1.1.3 Sporadyczna postać choroby Alzheimerera .....	7
1.2 Mitochondria i mitochondrialny DNA w chorobie Alzheimerera .....	8
1.2.1 Dysfunkcja mitochondriów jest obecna we wczesnym stadium AD .....	8
1.2.2 Stres oksydacyjny w AD .....	10
1.2.3 Rola A $\beta$ i A $\beta$ PP w dysfunkcji mitochondriów .....	11
1.2.4 Rola zmienności mtDNA w chorobie Alzheimerera .....	13
1.2.4.1 Mitochondrialny DNA .....	14
1.2.4.2 Region kontrolny .....	15
1.2.4.3 mtDNA mutuje częściej niż nDNA .....	15
1.2.4.4 Haplogrupy mitochondrialne .....	16
1.2.4.5 Haplogrupy mitochondrialne a sprzężanie-rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej .....	19
1.2.5 Rola zmian sekwencji genów jądrowych w patogenezie AD .....	20
1.2.5.1 Wpływ zmienności polimorficznej <i>APOE</i> na ryzyko AD .....	20
1.2.5.2 <i>TFAM</i> .....	21
1.2.5.3 <i>PGC-1<math>\alpha</math></i> .....	22
1.2.5.4 <i>PINI</i> .....	24
1.2.5.5 <i>HFE</i> .....	26
<b>2 CELE PRACY .....</b>	<b>31</b>
<b>3 BADANI, MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>33</b>
3.1 Omówienie badanych grup .....	33
3.2 Analiza zmienności genu <i>PINI</i> .....	34
3.3 Zastosowane techniki .....	34
3.3.1 Izolacja DNA i RNA z krwi obwodowej .....	34
3.3.2 Pomiar spektrofotometryczny DNA oraz RNA .....	34
3.3.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy, PCR .....	34
3.3.3.1 Amplifikacja regionu kontrolnego mtDNA .....	35
3.3.3.2 Amplifikacja fragmentów sekwencji kodującej mtDNA w celu zaklasyfikowania nosicieli haplogrupy H do podhaplogrup i podtypów .....	36
3.3.3.3 Amplifikacja fragmentu genu <i>APOE</i> .....	36
3.3.3.4 Amplifikacja sekwencji genu <i>PINI</i> .....	36
3.3.4 Rozdział elektroforetyczny .....	36
3.3.5 Oczyszczanie produktu PCR .....	37
3.3.6 Bezpośrednie sekwencjonowanie fluorescencyjne .....	37
3.3.6.1 Sekwencjonowanie oraz analiza regionu kontrolnego mtDNA .....	37
3.3.7 Zastosowanie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych do identyfikacji podhaplogrup H1 i H3 .....	38
3.3.8 Zastosowanie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych do określenia genotypu <i>APOE</i> .....	38
3.3.9 Wysokosprawna chromatografia cieczowa w warunkach denaturujących .....	39
3.3.10 Genotypowanie z zastosowaniem analizy dyskryminacji alleli z wykorzystaniem sond TaqMan i <i>real-time</i> PCR .....	40
3.3.11 Analiza ekspresji mRNA genu <i>PINI</i> w leukocytach krwi obwodowej .....	40
3.3.11.1 Izolacja RNA .....	40
3.3.11.2 Synteza cDNA .....	41
3.3.11.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym .....	41

3.3.11.3.1	Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA ze względną oceną ilości produktu w czasie rzeczywistym .....	41
3.3.12	Analiza bioinformatyczna .....	42
3.3.12.1	Zastosowane programy do analizy in silico nowych wariantów w sekwencji DNA .....	42
3.3.12.2	Zastosowane programy do analizy in silico sekwencji mitochondrialnego DNA .....	43
3.3.13	Najważniejsze z zastosowanych odczynników .....	43
3.3.14	Analiza statystyczna.....	44
3.3.14.1	Analiza interakcji z zastosowaniem programu Multifactor Dimensionality Reduction.....	44
3.3.14.2	Analiza haplotypów z zastosowaniem programu Haploview .....	45
3.3.14.3	Metaanaliza z zastosowaniem programu Meta-DiSc .....	45
<b>4</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>47</b>
4.1	Allel <i>APOE4</i> znanym czynnikiem ryzyka zachorowania na LOAD .....	47
4.1.1	Wpływ statusu <i>APOE4+</i> na wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD .....	48
4.2	Wpływ zmienności mtDNA na ryzyko AD.....	50
4.2.1	Identyfikacja haplogrup, podhaplogrup i podtypów mtDNA .....	50
4.2.1.1	Haplogrupa H jest najczęstszą haplogrupą we wszystkich badanych grupach.....	51
4.2.1.2	Haplogrupa H jest związana z wyższym ryzykiem LOAD .....	52
4.2.1.3	Haplogrupa T zmniejsza ryzyko LOAD u kobiet.....	54
4.2.1.4	Brak wpływu haplogrup mitochondrialnych na ryzyko EOAD .....	54
4.2.1.5	Brak związku między posiadaną haplogrupą mitochondrialną a wiekiem zachorowania na LOAD.....	54
4.2.1.6	Haplogrupy a nosicielstwo allelu <i>APOE4</i> .....	55
4.2.2	Analiza częstości wybranych polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA .....	56
4.2.3	Analiza klasterów haplogrup mitochondrialnych .....	57
4.2.3.1	Klaster HV zwiększa ryzyko LOAD .....	57
4.2.3.2	Klaster TJ obniża ryzyko LOAD w grupie kobiet, a klaster KU – w grupie mężczyzn.....	59
4.2.3.3	Brak związku częstości klasterów haplogrup mitochondrialnych z ryzykiem EOAD .....	60
4.2.3.4	Związek haplogrup mitochondrialnych oraz ich klasterów z konwersją łagodnych zaburzeń poznawczych do LOAD .....	60
4.2.4	Późnoobjawowa choroba Alzheimera w grupie stulatków .....	61
4.2.5	Haplogrupa J czynnikiem niesprzyjającym długowieczności.....	63
4.2.6	Analiza podhaplogrup i ich podtypów .....	64
4.2.6.1	Analiza częstości podhaplogrup i podtypów haplogrupy H .....	64
4.2.6.1.1	Interakcja podhaplogrupy H5 i <i>APOE4</i> .....	65
4.2.6.2	Haplogrupy i podhaplogrupy związane z fenotypem częściowego rozpręgnięcia fosforylacji oksydacyjnej obniżają ryzyko LOAD .....	66
4.2.7	Analiza zmienności regionu kontrolnego mtDNA w grupie AD w porównaniu z grupą kontrolną.....	67
4.2.7.1	Identyfikacja nowych wariantów mtDNA.....	69
4.2.7.2	Różnice w częstości polimorfizmów w regionie kontrolnym w grupie AD oraz w grupie stulatków w porównaniu z grupą kontrolną.....	70
4.3	Badanie wpływu zmienności genów jądrowych na ryzyko AD .....	71
4.3.1	Analiza roli wybranych dwóch polimorfizmów <i>TFAM</i> w AD.....	71
4.3.1.1	Polimorfizm rs1937 (c.35G>C, Ser12Thr) <i>TFAM</i> .....	71
4.3.1.2	Polimorfizm rs2306604 (c.441+113A>G) <i>TFAM</i> .....	75
4.3.1.3	Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs1937 i rs2306604.....	77
4.3.2	Analiza roli polimorfizmu Gly482Ser <i>PGC-1α</i> w AD .....	78
4.3.2.1	Związek polimorfizmu Gly482Ser z konwersją łagodnych zaburzeń poznawczych do LOAD.....	79
4.3.3	Analiza związku wybranych polimorfizmów genu <i>HFE</i> z ryzykiem AD .....	81
4.3.3.1	Polimorfizm His63Asp <i>HFE</i> .....	81
4.3.3.2	Polimorfizm Cys282Tyr <i>HFE</i> .....	82
4.3.4	Analiza związku zmienności <i>PIN1</i> z ryzykiem AD.....	82
4.3.4.1	Polimorfizmy <i>PIN1</i> a zmienność mtDNA i pozostałych badanych genów jądrowych. ....	84
4.3.4.1.1	Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami w <i>PIN1</i> i <i>HFE</i> .....	84
4.3.4.2	Zidentyfikowane nowe warianty w sekwencji <i>PIN1</i> .....	85
4.3.4.2.1	Analiza bioinformatyczna wariantu g.9805833T>C .....	85
4.3.4.2.2	Analiza bioinformatyczna mutacji c.382+105C>T .....	86



4.3.4.2.3	Analiza bioinformatyczna wariantu c.24G>T .....	86
4.3.4.2.4	Analiza bioinformatyczna wariantu c.58+64C>T .....	87
4.3.4.2.5	Analiza ekspresji PIN1 u nosicielki c.58+64C>T .....	88
<b>5</b>	<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>89</b>
5.1	Allel <i>APOE4</i> czynnikiem ryzyka LOAD, ale nie w grupie stulatków .....	89
5.2	Rola zmienności mtDNA w tworzeniu ryzyka AD .....	90
5.2.1	Haplogrupa H i klaster HV zwiększają ryzyko zachorowania na LOAD .....	90
5.2.1.1	Synergistyczna relacja pomiędzy podhaplogrupą H5 a <i>APOE4</i> zwiększa ryzyko LOAD ..	92
5.2.2	Haplogrupa H a sprzężanie/rozprzężanie fosforylacji oksydacyjnej .....	93
5.3	Zmienność sekwencji regionu kontrolnego mtDNA u chorych z LOAD .....	97
5.3.1	Występowanie zmian heteroplazmatycznych w regionie kontrolnym w badanych grupach .....	98
5.4	Analiza roli zmienności wybranych genów jądrowych w AD .....	99
5.4.1	Rola polimorfizmów rs1937 i rs2306604 <i>TFAM</i> .....	99
5.4.2	Rola polimorfizmu Gly482Ser (rs8192678) <i>PGC-1α</i> .....	100
5.4.3	Rola polimorfizmów His63Asp oraz Cys282Tyr <i>HFE</i> .....	101
5.4.4	Rola zmienności <i>PINI</i> .....	102
5.5	Krótkie podsumowanie wyników .....	103
5.6	Oddziaływania epistatyczne między badanymi czynnikami .....	105
5.7	Struktura grupy badanej wpływa na identyfikację genetycznych czynników ryzyka AD .....	106
5.8	Uwagi końcowe .....	106
<b>6</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>SUPLEMENT .....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>SPIS RYCIN .....</b>	<b>135</b>
<b>10</b>	<b>SPIS TABEL .....</b>	<b>137</b>
<b>11</b>	<b>PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>139</b>



## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Oryginalna nazwa w języku angielskim, od której pochodzi skrót
$\chi^2$	chi kwadrat	
6-FAM	6-karboksylo-fluoresceina	<i>6-carboxyfluorescein</i>
A $\beta$	$\beta$ -amyloid	<i>Amyloid-<math>\beta</math></i>
A $\beta$ PP	białko prekursorowe $\beta$ -amyloidu	<i>Amyloid-<math>\beta</math> Precursor Protein</i>
AD	choroba Alzheimerera	<i>Alzheimer's Disease</i>
APOE	apolipoproteina E	<i>Apolipoprotein E</i>
APOE2	allel $\epsilon$ 2 apolipoproteiny E	<i>Apolipoprotein E <math>\epsilon</math>2 Allele</i>
APOE3	allel $\epsilon$ 3 apolipoproteiny E	<i>Apolipoprotein E <math>\epsilon</math>3 Allele</i>
APOE4	allel $\epsilon$ 4 apolipoproteiny E	<i>Apolipoprotein E <math>\epsilon</math>4 Allele</i>
ATP	adenozyno-5'-trifosforan	<i>Adenosine-5'-Triphosphate</i>
ATP6	podjednostka 6 syntazy ATP	<i>ATP Synthase F0 Subunit 6</i>
A $\beta$ <sub>42</sub>	$\beta$ -amyloid o długości 42 aminokwasów	
BIM <sub>EL</sub>		<i>Bcl-2 Homology 3-Only Protein</i>
C/EBP	czynnik transkrypcyjny wiążący się do sekwencji CCAAT	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
Cdc25	fosfataza Cdc25	<i>Cell Division Cycle 25 Phosphatase</i>
cDNA	komplementarny DNA	<i>Complementary DNA</i>
CI	przedział ufności	<i>Confidence Interval</i>
CMR <sub>glc</sub>	mózgowy wskaźnik metabolizmu glukozy	<i>Cerebral Metabolic Rate Of Glucose</i>
COI	podjednostka I oksydazy cytochromowej	<i>Cytochrome Oxidase Subunit I</i>
COX	oksydaza cytochromowa	<i>Cytochrome Oxidase</i>
CREB	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP	<i>cAMP-Response-Element-Binding Protein</i>
Ct	cykl progowy	<i>Threshold Cycle</i>
CVC	spójność walidacji krzyżowej	<i>Cross-Validation Consistency</i>
CYTB	cytochrom b	<i>Cytochrome B</i>
D'	znormalizowany współczynnik nierównowagi	
ddNTP	trifosforan dideoksyrybonukleozydu	<i>Dideoxynucleoside Triphosphate</i>
DEPC	eter dietylowy kwasu pirowęglowego	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
df	stopnie swobody	<i>Degrees Of Freedom</i>
DHPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w warunkach denaturujących	<i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>
DNAza	deoksyrybonukleaza	<i>Deoxyribonuclease</i>
DTP	trifosforan deoksyrybonukleozydu	<i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EOAD	wczesnoobjawowa choroba Alzheimerera	<i>Early-Onset Alzheimer's Disease</i>
ESE	eksonowy wzmacniacz splicingu	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
FAD	rodzinna postać choroby Alzheimerera	<i>Familial Alzheimer's Disease</i>
FDG	2-[ <sup>18</sup> F]-fluoro-2-deoksy-D-glukoza	<i>2-[<sup>18</sup>F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose</i>
GWAS	analiza asocjacyjna w skali całego genomu	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HFE	gen hemochromatozy	<i>Hemochromatosis Gene</i>
HVS	region hiperzmienny	<i>Hypervariable Segment</i>
JIP3		<i>JNK Interacting Protein 3</i>
JNK	kinaza N-końcowa c-Jun	<i>C-Jun N-Terminal Kinase</i>

LD	nierównowaga sprzężeń	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LOAD	późnoobjawowa choroba Alzheimera	<i>Late-Onset Alzheimer's Disease</i>
LOD	logarytm dziesiętny prawdopodobieństwa	<i>Logarithm<sub>10</sub> of Odds</i>
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne	<i>Long-Term Potentiation</i>
m.	mitochondrialny	
MCI	łagodne zaburzenia poznawcze	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MDR		<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>
Me	mediana	<i>Median</i>
MGB	białko wiążące się do mniejszego bruzdy DNA	<i>Minor Groove Binder</i>
MMSE	Krótką Skala Oceny Stanu Psychicznego	<i>Mini-Mental State Examination</i>
mRNA	matrycowy (lub informacyjny) RNA	<i>Messenger RNA</i>
mtDNA	Mitochondrialny DNA	<i>Mitochondrial DNA</i>
n	liczba badanych	<i>Number</i>
nd.	nie dotyczy	
nDNA	jądrowe DNA	<i>Nuclear DNA</i>
NFQ	niefluorescencyjny barwnik tłumiący	<i>Non-Fluorescent Quencher</i>
NFT	Zwyrodnienie neurofibrilne	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NRF1	jądrowy czynnik oddechowy 1	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>
NRF2	jądrowy czynnik oddechowy 2	<i>Nuclear Respiratory Factor 2</i>
nt	nukleotyd	<i>Nucleotide</i>
OH	miejsce początku syntezy nici H	<i>H-Strand Origin</i>
OR	iloraz szans	<i>Odds Ratio</i>
TP53	białko p53	<i>Tumor protein 53</i>
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET	pozytronowa tomografia emisyjna	<i>Positron Emission Tomography</i>
PGC-1 $\alpha$	Koaktywator 1 $\alpha$ receptorów- $\gamma$ aktywowanych przez proliferatory peroksyosomów	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-<math>\gamma</math> Coactivator-1<math>\alpha</math></i>
PIN1	izomeraza cis-trans peptydylo-prolylowa 1, oddziałująca z NIMA	<i>Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerase, NIMA-Interacting 1</i>
PKM $\zeta$	kinaza białkowa M $\zeta$	<i>Protein Kinase M <math>\zeta</math>,</i>
PSEN1	Presenilina 1	<i>Presenilin 1</i>
PSEN2	Presenilina 2	<i>Presenilin 2</i>
pz	Para zasad	
rCRS	Zrewidowana sekwencja referencyjna mitochondrialnego DNA	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i>
RK	region kontrolny	<i>Control Region</i>
RNA	Kwas rybonukleinowy	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNaza H	rybonukleaza H	<i>Ribonuclease H</i>
rRNA	rybosomowy RNA	<i>Ribosomal RNA</i>
RT	temperatura pokojowa	<i>Room Temperature</i>
RT-PCR	PCR z odwrotną transkryptazą	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
SAD	sporadyczna postać choroby Alzheimera	<i>Sporadic Alzheimer's Disease</i>
SDHA	podjednostka A dehydrogenazy bursztynianowej	<i>Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A</i>
SF	współczynnik synergii	<i>Synergy Factor</i>
SNP	pojedyncze podstawienie jednonukleotydowe	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ssDNA	jednoniciowy DNA	<i>Single Stranded DNA</i>
starter F	starter 5'	<i>Forward Primer</i>
starter R	starter 3'	<i>Reverse Primer</i>
status APOE4-	brak allelu APOE4	
status APOE4+	nosicielstwo przynajmniej jednego allelu	

---

TAMRA	<i>APOE4</i> 6-karboksylotetrametylorodamina	<i>6-Carboxy-Tetramethylrhodamine</i>
TBE	tris-boran-EDTA	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
TEAA	octan trietyloamonowy	<i>Triethylammonium Acetate</i>
TET	tetrachloro-6-karboksyl-fluoresceina	<i>Tetra-Chloro-6-Carboxyfluorescein</i>
TF1	czynnik transkrypcyjny 1	<i>Transcription Factor 1</i>
TF2	czynnik transkrypcyjny 2	<i>Transcription Factor 2</i>
TFAM	mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A	<i>Mitochondrial Transcription Factor A</i>
Tm	temperatura topnienia	<i>Melting Temperature</i>
Tris	(hydroksymetylo) aminometan	<i>(Hydroxymethyl)-Amino-Methane</i>
tRNA	transportujący RNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>
UV	ultrafiolet	<i>Ultraviolet</i>
wt	forma prawidłowa	<i>Wild Type</i>



# 1 WSTĘP

## 1.1 Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (*Alzheimer's disease*, AD) została wyodrębniona jako jednostka nozologiczna przez Emila Kraepelina na podstawie opisów klinicznych wykonanych przez Aloïsa Alzheimera i Gaetano Perusinię (Alzheimer, 1906; Lucci, 1998). AD jest przewlekłą, postępującą i jednocześnie najczęstszą chorobą neurozwyrodnieniową (Kalaria i wsp., 2008). Należy do najczęstszych schorzeń wieku podeszłego, dotykając od ok. 5% osób po 65 r.ż. do ponad 30% populacji po 80 r.ż. (Nelson i wsp., 2009). Jest także najczęstszą przyczyną zespołów otępiennych w Ameryce Północnej oraz w Europie. Szacuje się, że w 2040 r. liczba chorych na świecie sięgnie 81,1 mln (Ferri i wsp., 2005). W Polsce rozpowszechnienie AD jest zbliżone do krajów zachodniej Europy (Gabryelewicz i wsp., 1999; Wender i wsp., 1990; Rossa, 1997). U osób w wieku 65 lat ryzyko AD w dalszych latach życia wynosi 20% dla kobiet i 10% dla mężczyzn (Seshadri i Wolf, 2007).

AD ma klinicznie nieuchwytny początek. Obecnie uważa się, że proces prowadzący do rozwinięcia pełnoobjawowej AD rozpoczyna się już w średnim wieku, 20-30 lat przed wystąpieniem zauważalnego pogorszenia funkcji poznawczych (Debette i wsp., 2009). Zanim jednak pojawią się objawy charakterystyczne dla AD, występuje stadium określane jako łagodne zaburzenia poznawcze (*mild cognitive impairment*, MCI), opisywane jako stan przejściowy między tzw. "normalnym" starzeniem się a otępieniem (Petersen i wsp., 1999). Łagodne zaburzenia poznawcze mogą prowadzić do AD. Co roku ok. 10-15% osób z diagnozą MCI rozwija AD, co jest określane jako tzw. konwersja (Petersen i wsp., 1999). Kolejno dochodzi do stopniowego pogarszania się codziennej aktywności życiowej, utraty pamięci i pozostałych funkcji poznawczych, zaburzeń zachowania, nieuchronnie prowadząc do głębokiego otępienia i całkowitej niezdolności do samodzielnego funkcjonowania.

AD charakteryzuje występowanie zmian neuropatologicznych - blaszek amyloidowych (*amyloid plaques*)<sup>1</sup>, których rdzeń jest zbudowany z  $\beta$ -amyloidu (A $\beta$ ), oraz zwyrodnienia neurofibrilarnego (*neurofibrillary tangles*, NFT), w którego skład wchodzi nieprawidłowo ufosorylowane białko tau (Arnold i wsp., 1991, Braak i Braak, 1991, 1997). Ich obecność nie przesądza jednak o wystąpieniu AD, gdyż zarówno blaszki amyloidowe, jak i NFT są odnajdywane w mózgach zdrowych osób w podeszłym wieku, także u zdrowych stulatków (Nelson i wsp., 2009). Ostateczna diagnoza AD stawiana jest tylko osobom, u których stwierdzono objawy AD, a w badaniu autopsyjnym obecność blaszek amyloidowych i NFT. Poddaje się dyskusji ich patogeniczność, podejrzewając, że mogą towarzyszyć bądź stanowić jedynie konsekwencję rzeczywistych procesów patologicznych (Nelson i wsp., 2009).

AD jest chorobą wieloczynnikową, w której powstawaniu i przebiegu klinicznym współdziałają, w nadal nie do końca jasny sposób, czynniki genetyczne i pozagenetyczne. Przyjmuje

---

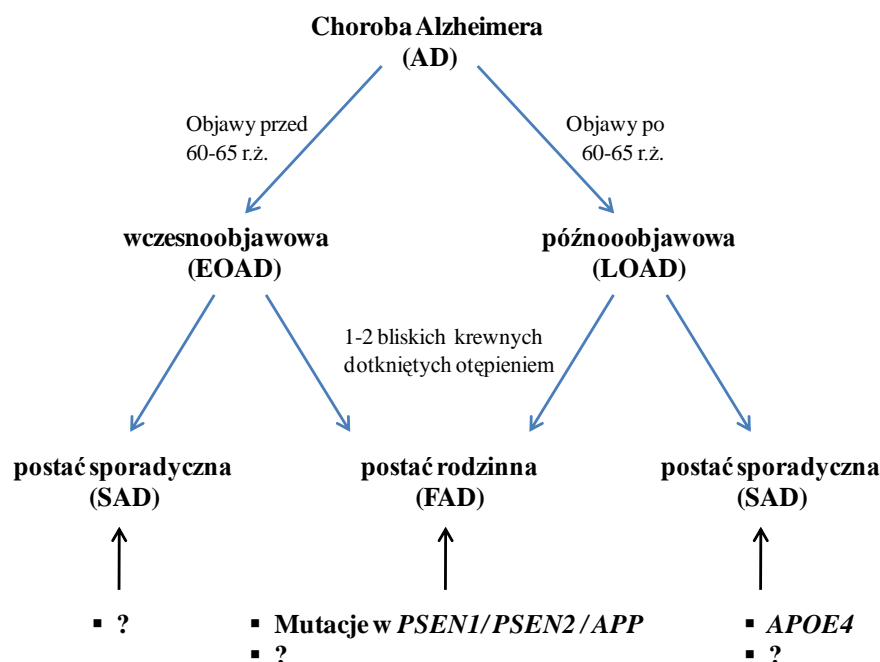
<sup>1</sup> Blaszkami amyloidowymi nazywane są również blaszkami starczymi, blaszkami neurytycznymi, złogami amyloidu oraz plakami.

się, że wiele z tych czynników modyfikuje ryzyko zachorowania, nie wywołując bezpośrednio AD. Badania zmierzające do określenia genetycznych czynników ryzyka, dotychczas przyczyniły się jedynie w niewielkim stopniu do wyjaśnienia patomechanizmu AD.

### 1.1.1 Wczesna i późna postać choroby Alzheimera

Wyróżniono wczesno- (*early-onset AD*, EOAD) i późnoobjawową AD (*late-onset AD*, LOAD), uwzględniając arbitralnie ustanowioną granicę 60-65 lat wystąpienia pierwszych objawów (Ryc. 1). EOAD i LOAD mają podobny obraz kliniczny, aczkolwiek EOAD charakteryzuje zazwyczaj znacznie bardziej dynamiczna progresja.

Poza rozróżnieniem na EOAD i LOAD, wyodrębnia się dwa kolejne podtypy AD – postać rodzinną (*familial AD*, FAD) i sporadyczną (*sporadic AD*, SAD). Ten podział pokrywa się z powyższym, oddając obecność rodzinnej historii choroby, dziedziczonej w sposób mendelowski. Główne postaci AD przedstawiono na Rycinie 1.



**Ryc. 1. Postacie choroby Alzheimera (AD) wraz ze znanymi czynnikami genetycznymi wpływającymi na zachorowanie;** EOAD – *early-onset AD*; LOAD – *late-onset AD*, FAD – *familial AD*; SAD – *sporadic AD*; APP - gen białka prekursorowego  $\beta$ -amyloidu; PSEN1- presenilina 1; PSEN2 - presenilina 2.

### 1.1.2 Rodzinna postać choroby Alzheimera

Rodzinna postać AD rozpoczyna się przeważnie w trzeciej lub czwartej dekadzie życia. Większość zachorowań na FAD wykazuje wyraźny autosomalny dominujący sposób dziedziczenia, zdarzają się jednak także zachorowania o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym (Tomiyama i wsp., 2008). FAD, stanowiąca ok. 1% wszystkich zachorowań na AD, jest u 30-50% chorych wywołana mutacją w jednym z trzech genów: białka prekursorowego  $\beta$ -amyloidu (*amyloid- $\beta$  precursor protein*,



*AβPP* lub *APP*), preseniliny 1 (*presenilin 1, PSEN1*) oraz preseniliny 2 (*presenilin 2, PSEN2*). Mutacje w *APP, PSEN1* i *PSEN2* prowadzą do zmiany wytwarzania Aβ, głównego składnika blaszek amyloidowych.

Aβ powstaje w wyniku amyloidogenego cięcia AβPP z udziałem dwóch enzymów, β- i γ-sekretazy. Proteoliza AβPP daje fragmenty Aβ o długości 39-42 aminokwasów, spośród których Aβ<sub>42</sub> jest uważany za najbardziej neurotoksyczny. Istnieje także drugi sposób cięcia AβPP, z udziałem α- i γ-sekretaz, który nie prowadzi do powstania Aβ, stąd jego nazwa – nieamyloidogeny (Bettens i wsp., 2010). Poza mutacjami w *APP, PSEN1* i *PSEN2* dotychczas nie zidentyfikowano innych genów, których mutacje mogłyby powodować AD.

### 1.1.3 Sporadyczna postać choroby Alzheimera

Chorzy z FAD nie różnią się zmianami neuropatologicznymi ani poznawczymi od chorych na sporadyczną postać AD, stąd postawiono hipotezę, że także w SAD Aβ odgrywa znaczącą rolę w patogenezie (Hardy i Higgins, 1992). Jest to jeden z postulatów hipotezy kaskady amyloidowej, głoszącej, że Aβ<sub>42</sub> indukuje powstanie NFT, neurodegenerację i otępienie (Hardy i Higgins, 1992). Część badaczy, choć nie neguje roli Aβ w AD, nie zgadza się z przesłanką o identycznej etiologii FAD i SAD (Swerdlow i Khan, 2004; Iqbal i Grundke-Iqbal, 2010; Coskun i wsp., 2010). Postulują oni, że etiopatogeneza pozostałych przypadków AD jest znacznie bardziej skomplikowana. Ponadto, doświadczenia ze szczepionką przeciwko Aβ pokazały, że choć możliwe jest usunięcie blaszek amyloidowych, nie chroni to przed postępującym upośledzeniem funkcji poznawczych ani nie redukuje ilości NFT (Holmes i wsp., 2008; Iqbal i Grundke-Iqbal, 2010).

Warto podkreślić, że w przypadku zachorowań na AD określanych jako sporadyczne (w kontraście do FAD), czynniki genetyczne także ogrywają istotną rolę, chociaż nie wykazują one cech dziedziczenia mendlowskiego (Lambert i Amouyel, 2011). Za ich udziałem przemawia m.in. obserwacja, że posiadanie krewnego pierwszego stopnia, chorego na LOAD, zwiększa 3-4 razy ryzyko rozwoju tej choroby (Van Gassen i Annaert, 2003). Z kolei badania bliźniąt sugerują, że czynniki genetyczne warunkują 37-78% różnic międzysobniczych w wieku zachorowania na AD (Meyer i Breitner, 1998), a wskaźnik odziedziczalności dla AD ma wartość ok. 0,8 (Plassman i Breitner, 1996). Ponadto, na ryzyko zachorowania na AD wpływa nosicielstwo jednego lub dwóch alleli apolipoproteiny (*apolipoprotein E, APOE*) ε4 (*APOE4*). *APOE4* jest jedynym powszechnie uznawanym genetycznym czynnikiem ryzyka LOAD (Strittmatter i wsp., 1993, Corder i wsp., 1993). Z drugiej strony, ok. 50% chorych z LOAD nie jest nosicielami allelu *APOE4*, co wskazuje na istnienie innych, w tym genetycznych czynników modyfikujących ryzyko zachorowania.

Dwie niespokrewnione ze sobą osoby mają wspólne ok. 99,9% sekwencji DNA. O zmienności międzysobniczej stanowią zmiany w DNA występujące co ok. 1-1,3 tysiące par zasad (pz) (Shastri, 2008). Chociaż wiele z nich nie ma znaczenia funkcjonalnego, sądzi się, że pozostałe odgrywają rolę w patogenezie chorób, reakcji na leczenie farmakologiczne czy na warunki środowiskowe. Zazwyczaj

---

wyróżnia się dwa rodzaje zmian sekwencji DNA – mutacje i polimorfizmy. W genetyce medycznej termin „mutacja” odnoszony jest przede wszystkim do zmian powiązanych w sposób przyczynowy z fenotypem choroby. Zmiany sekwencji określane jako „polimorfizm”, w swoim tradycyjnym znaczeniu charakteryzują się częstością rzadszego allelu o wartości  $>1\%$  w populacji ogólnej, oraz nie wpływają (zasadniczo) na fenotyp (Cotton, 1998). Allel *APOE4* jest przykładem, że jest to zbyt uogólniające podejście. Zarówno więc mutacja, jak i polimorfizm stanowią niejednoznaczne pojęcia. W niniejszej rozprawie, zidentyfikowane nowe zmiany będą określane jako warianty, nazywane według zasad Human Genome Variation Society (HGVS, <http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

Badania mające na celu zidentyfikowanie czynników genetycznych zaangażowanych w etiopatogenezę AD opierają się na dwóch podstawowych metodach. Jedne stawiają hipotezę *a priori*, że wybrany do badania gen kandydujący bądź szlak komórkowy odgrywa rolę w AD. Drugie podejście wykorzystuje hipotezy *post hoc*, jak w przypadku analizy asocjacyjnej w skali całego genomu (*genome-wide association study*, GWAS) czy badań sprzężeń, dzięki którym poznano geny związane z FAD. W niniejszej pracy przyjęto metodę wykorzystującą geny kandydujące.

W przebiegu AD, poza obecnością blaszek amyloidowych i NFT, obserwuje się także przede wszystkim zwyrodnienie a następnie zanik synaps oraz neuronów, zmiany typowe dla stresu oksydacyjnego i dysfunkcję mitochondriów. Zwrócono zatem uwagę na rolę mitochondrialnego DNA oraz wybranych genów jądrowych w AD. Ponadto, postanowiono także wykonać analizę zmienności genu odpowiedzialnego m.in. za zmiany konformacyjne tau i A $\beta$ PP. Stąd przedłożona rozprawa składa się z dwóch zasadniczych części, z których jedna opisuje rolę zmienności wybranych pięciu genów jądrowych, natomiast druga dotyczy wpływu polimorfizmów i mutacji w mtDNA oraz ich interakcji z genomem jądrowym w AD.

## **1.2 Mitochondria i mitochondrialny DNA w chorobie Alzheimera**

### **1.2.1 Dysfunkcja mitochondriów jest obecna we wczesnym stadium AD**

Wiele badań wskazuje, że dysfunkcja mitochondriów jest jednym z pierwszych zmian patofizjologicznych w przebiegu AD i poprzedza mierzalny spadek funkcji poznawczych oraz charakterystyczne dla AD zmiany neuropatologiczne. Mitochondria są miejscem integracji szeregu przemian metabolicznych, które zachodzą bądź krzyżują się w ich obrębie. Utrzymują homeostazę jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ), biorą udział w apoptozie i transdukcji sygnałów komórkowych, a przeprowadzana w nich fosforylacja oksydacyjna zaspokaja większość komórkowego zapotrzebowania na ATP. Dla neuronów fosforylacja oksydacyjna jest podstawowym źródłem energii. Mimo że mózg stanowi jedynie 2% masy ciała człowieka, konsumuje ok. 16% całkowitego tlenu zużywanego przez organizm (Costantini i wsp., 2008). Wykorzystuje go przede wszystkim do reakcji utleniania głównego substratu energetycznego mózgu – glukozy, do dwutlenku węgla oraz wody. Dysfunkcja mitochondriów, charakteryzująca się zmniejszonym metabolizmem glukozy, zmianą aktywności enzymów mitochondrialnych, oraz stresem oksydacyjnym, jest obecna we wszystkich

stadiach AD i potęguje się wraz z jej progresją. Dysfunkcję mitochondriów stwierdzono w mózgach, fibroblastach oraz komórkach krwi chorych, w mysich transgenicznym modelach AD oraz liniach komórkowych ekspresujących zmutowane A $\beta$ PP lub traktowanych A $\beta$  (Nunomura i wsp., 2006).

Jednym z najlepiej udokumentowanych objawów dysfunkcji mitochondriów w AD jest spadek wartości mózgowego wskaźnika metabolizmu glukozy (*cerebral metabolic rate of glucose*, CMRglu<sup>2</sup>), badanego techniką pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) z zastosowaniem radioaktywnego znacznika, 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoksy-D-glukozy (FDG). CMRglu jest wskaźnikiem aktywności i gęstości synaps mózgowych (Mosconi i wsp., 2008).

Obniżenie wartości CMRglu u chorych z AD zostało zaobserwowane już w 1983 r. (de Leon i wsp., 1983). Chorzy z AD wykazują obniżone wiązanie FDG w obszarze ciemieniowo-skroniowym, zakręcie obręczy, oraz w mniejszym stopniu w płatach czołowych i przyśrodkowej części płatów skroniowych, w porównaniu ze zdrowymi osobami, zgodnymi pod względem wieku z chorymi (Mosconi i wsp., 2010). Wykluczono, aby atrofia wpływała w znaczący sposób na poziom metabolizmu mózgowego (Mosconi i wsp., 2006). Ponadto, spadek metabolizmu glukozy nie jest skorelowany z nagromadzeniem złogów amyloidowych (Johnson, 2006; Furst i wsp., 2010). Wiele danych wskazuje, że charakterystyczny dla AD wzorec hipometabolizmu mózgowego pojawia się już w okresie przedklinicznym, poprzedzając wystąpienie zaburzeń neuropsychologicznych i zaników korowych (Mosconi i wsp., 2006, 2009; Reiman i wsp., 2004).

Ponadto, stwierdzono, że zaburzenie metabolizmu (wywołane poprzez np. hipoksję, hipoglikemię, niedobór witamin) jest wystarczające, aby wywołać deficyty psychiczne i neurologiczne, podobne do tych występujących w przebiegu AD (Blass i Gibson, 1999), co sugeruje, że dysfunkcja mitochondriów może odgrywać bardzo ważną rolę na wczesnym etapie AD. Neurony projekcyjne, które są jednymi z pierwszych obumierających w przebiegu AD, wykazują dużą wrażliwość na obniżoną wydajność mitochondriów (Gotz i wsp., 2009). Ponadto, niedawno wykazano, że dla konsolidacji śladów pamięciowych niezbędna jest niezaburzone działanie łańcucha oddechowego (Tanaka i wsp., 2008).

W zdrowych neuronach mitochondria są zlokalizowane przede wszystkim w synapsach, wytwarzając ATP niezbędne w procesach neurotransmisji oraz utrzymując homeostazę jonów wapnia (Chang i Reynolds, 2006). Stąd dysfunkcja mitochondriów, ich zmieniona liczba, morfologia oraz zaburzona dynamika, prowadząca do zakłócenia transportu mitochondriów z ciała neuronu do synaps, mogą wpływać na fizjologię synaps i prowadzić do upośledzenia plastyczności neuronalnej (Anandatheerthavarada i Devi, 2007; Zhu i wsp., 2007; Wang i wsp., 2008b). Wykazano, że utrata zakończeń synaptycznych koreluje z zaburzeniami poznawczymi silniej niż poziom blaszek amyloidowych czy zanik neuronów. Ponadto utrata synaps rozpoczyna się na bardzo wczesnym stadium AD (Terry i wsp., 1991), na przykład u osób z diagnozą MCI stwierdzono mniejszą o 18% ilość synaps w porównaniu z grupą kontrolną (Bayer i Wirths, 2010).

---

<sup>2</sup> W literaturze stosowane są także skróty CMRglc i CMRgl.

---

Kolejną cechą dysfunkcji mitochondriów w AD jest obniżona aktywność dwóch ważnych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych: kompleksu dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranowej oraz kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, a także oksydazy cytochromowej (*cytochrome oxidase*, COX), która stanowi kompleks IV łańcucha oddechowego (Swerdlow i wsp., 2010; Parker i wsp., 1990). Zmniejszona aktywność wspomnianych enzymów nie jest jedynie ograniczona do obszarów mózgu objętych neuropatologią. Dla przykładu, spadek aktywności COX, pomimo niezmiennego poziomu podjednostek, jest obserwowany także w fibroblastach i płytkach krwi chorych oraz w płytkach krwi osób z rozpoznaniem MCI, a także w modelach cybrydowych<sup>3</sup>, zawierających mtDNA osób z AD (Cardoso i wsp., 2004; Trimmer i wsp., 2004; Swerdlow i wsp., 1997; Parker i wsp., 1990). Ponadto, zahamowanie aktywności COX, podobnie jak rozprzęgnięcie fosforylacji oksydacyjnej oraz inhibicja syntazy ATP, sprzyja amyloidogennemu cięciu A $\beta$ PP (Gabuzda i wsp., 1994; Webster i wsp., 1998). Co więcej, w neuronach poddanych działaniu inhibitorów łańcucha oddechowego zaobserwowano także fosforylację białka tau (Escobar-Khondiker i wsp., 2007). Stwierdzono, że stres oksydacyjny prowadzi do agregacji tau (Nunomura i wsp., 2010).

### 1.2.2 Stres oksydacyjny w AD

Dysfunkcja mitochondriów w AD przejawia się mniej efektywną produkcją ATP i wzmożonym wytwarzaniem wolnych rodników, będących fizjologicznym produktem ubocznym fosforylacji oksydacyjnej (Mancuso i wsp., 2007). Poziom markerów stresu oksydacyjnego jest znacząco wyższy u chorych na AD oraz u osób z rozpoznaniem MCI w porównaniu ze zdrowymi osobami, wiekiem odpowiadającymi badanym (Smith i wsp., 2010). W mózgach, płynach biologicznych i tkankach obwodowych chorych na AD stwierdza się uszkodzenia oksydacyjne lipidów, kwasów nukleinowych oraz białek (Nunomura i wsp., 2006). Również w modelach komórkowych oraz mysich modelach transgenicznych AD obserwowane są zmiany charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego (Trimmer i wsp., 2004).

Mózg jest szczególnie narażony na uszkodzenia oksydacyjne. W porównaniu z innymi organami jest dość ubogo wyposażony w składniki systemu antyoksydacyjnego. Ponadto, charakteryzuje go wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych, łatwo ulegających peroksydacji (Nunomura i wsp., 2006). Mózg jest także bogaty w jony żelaza i miedzi, które akumulują się z wiekiem i mogą stanowić katalizator powstawania wolnych rodników. Wzmożona produkcja wolnych rodników w wyniku dysfunkcji mitochondriów stanowi szczególne zagrożenie dla neuronów (Guglielmotto i wsp., 2010).

Warto zaznaczyć, że związane z wiekiem i stylem życia czynniki ryzyka zachorowania na AD, takie jak nadciśnienie, uraz mózgu, cukrzyca, hipercholesterolemia, hiperhomocysteinemia, palenie,

---

<sup>3</sup> Cybrydy (*cybrids*) – trans-mitochondrialne cytoplazmatyczne hybrydy; technikę ich uzyskiwania opracowali King i Attardi (1989). Komórki osoby badanej po usunięciu jąder komórkowych poddaje się fuzji z komórkami pozbawionymi mtDNA ( $\rho^0$ ). Zastosowanie cybryd umożliwia badanie wpływu zmienności mtDNA na fenotyp komórki w warunkach kontrolowanych.

dieta wysokokaloryczna, czy brak ruchu, przyczyniają się do podwyższenia stresu oksydacyjnego (Kalaria i wsp., 2008). Natomiast wśród czynników protekcyjnych znajdują się uznane zmiatacze wolnych rodników, np. witaminy C i E, estrogeny, niesteroidowe leki przeciwzapalne, statyny, oraz restrykcja kaloryczna (Nunomura i wsp., 2006).

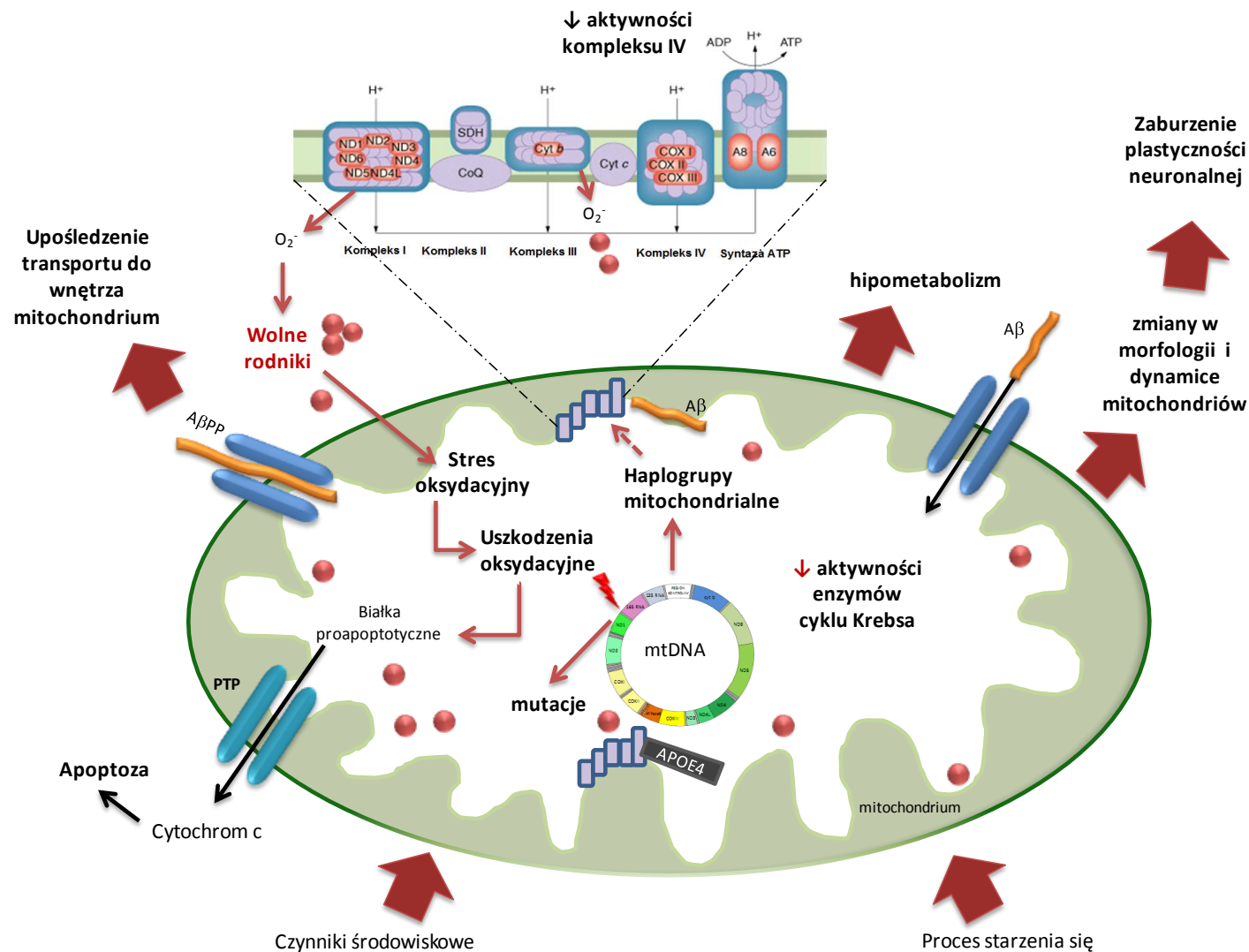
### 1.2.3 Rola A $\beta$ i A $\beta$ PP w dysfunkcji mitochondriów

Wiele wskazuje na to, że stres oksydacyjny i dysfunkcja mitochondriów poprzedzają pojawienie się złożeń A $\beta$  (Reddy i Beal, 2005). Stres oksydacyjny, wpływając na poziom  $\gamma$ - i  $\beta$ -sekreazy, przyczynia się do wzrostu ekspresji A $\beta$ PP oraz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego poziomu A $\beta$  w neuronach i astrocytach (Guglielmotto i wsp., 2010). Postuluje się, że wytwarzanie A $\beta$  i hiperfosforylacja białka tau stanowią na wczesnym etapie AD mechanizm kompensacyjny, będący odpowiedzią na uszkodzenia oksydacyjne w mózgu (Moreira i wsp., 2006; Nunomura i wsp., 2006, 2010; Zhu i wsp., 2007). A $\beta$  w postaci neoligomerycznej i w niskim stężeniu może mieć działanie antyoksydacyjne (Kontush, 2001; Nunomura i wsp., 2010). A $\beta$ , chelatując metale grup przejściowych (cynk, żelazo, miedź), może zapobiegać utlenianiu molekuł komórkowych, katalizowanemu z udziałem tych metali. Z drugiej strony, wraz z progresją AD antyoksydacyjne właściwości A $\beta$  ustępują miejsca działaniu prooksydacyjnemu, przekroczone zostaje fizjologiczne stężenie A $\beta$  i dochodzi do jego nukleacji (Nunomura i wsp., 2006). A $\beta$  katalizuje redukcję metali grup przejściowych z uwolnieniem nadtlenu wodoru, co prowadzi do peroksydacji molekuł komórkowych (Zhu i wsp., 2007).

Obecnie uznaje się, że zewnątrzkomórkowe blaszki amyloidowe mają słabszy wpływ na proces neurozwyrodnieniowy w porównaniu z wewnątrzkomórkowym A $\beta$  (Bayer i Wirths, 2010). Zarówno A $\beta$ PP, jak i A $\beta$  są obecne w mitochondriach w mózgach chorych na AD, gdzie wzmagają produkcję wolnych rodników, obniżając aktywność COX i zmniejszając produkcję ATP (Devi i wsp., 2006; Hansson Petersen i wsp., 2008). A $\beta$ PP podlega niekompletnemu procesowi importu do mitochondriów, co może być związane z zahamowaniem transportu do mitochondrium białek kodowanych przez genom jądrowy (Anandatheerthavarada i Devi, 2007; Devi i wsp., 2006; Keil i wsp., 2004) (por. Ryc. 2). Przykładowo, wykazano, że następuje zahamowanie importu podjednostek IV oraz Vb oksydazy cytochromowej (Devi i wsp., 2006).

W warunkach *in vitro* A $\beta$  jest inhibitorem kompleksu IV, co jak się wydaje, wynika z procesów gromadzenia monomerów i dimerów A $\beta$  w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, miejscu zakotwiczenia kompleksów łańcucha oddechowego (Devi i wsp. 2006; Hansson Petersen i wsp., 2008; Keil i wsp., 2004). Ponadto, A $\beta$  zaburza dynamikę mitochondriów i wpływa na ich morfologię, prowadząc do ich fragmentacji (Cho i wsp., 2009).

Te obserwacje nie wykluczają możliwości, że dysfunkcja mitochondriów jest pierwotnym zaburzeniem w AD, ponieważ zaburzona ekspresja białek mitochondrialnych oraz ich zaburzona funkcja są obserwowane przed pojawieniem się blaszek amyloidowych w mysim modelu



Ryc. 2. Dysfunkcja mitochondriów w chorobie Alzheimera. Najważniejsze czynniki wpływające na funkcje mitochondriów (czynniki genetyczne związane z mtDNA, czynniki środowiskowe, proces starzenia się, stres oksydacyjny, obecność wewnątrz mitochondriów Aβ, AβPP, fragmentów APOE4) oraz konsekwencje dysfunkcji. Dokładny opis w tekście.

transgenicznym AD (Gillardon i wsp., 2007). Pozostaje nierozstrzygnięte, czy dysfunkcja mitochondriów zmienia zachowanie A $\beta$  czy to zmiany w powstawaniu różnych form A $\beta$  wpływają na funkcje mitochondriów w AD.

#### 1.2.4 Rola zmienności mtDNA w chorobie Alzheimera

Model cybrydowy pozwolił sprawdzić wpływ mtDNA pochodzącego od chorych na AD na funkcje mitochondriów, w tym na aktywność COX (Khan i wsp., 2000; Trimmer i wsp., 2004; Swerdlow i wsp., 1997). Pomimo, że dziesięć podjednostek COX jest kodowanych przez jądrowy DNA (*nuclear DNA*, nDNA), a tylko trzy przez mtDNA, to właśnie wspomniane trzy mają największe znaczenie katalityczne. Cybrydy niosące mtDNA od chorych z AD charakteryzuje m.in. obniżona wydajność łańcucha oddechowego (w tym spadek aktywności COX), podwyższony stres oksydacyjny, obniżony potencjał błony mitochondrialnej, zmiany morfologii mitochondriów, aktywacja szlaków apoptotycznych, wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego A $\beta$ <sub>42</sub> (Cardoso i wsp., 2004; Keil i wsp., 2004; Khan i wsp., 2000; Trimmer i wsp., 2004; Swerdlow i wsp., 1997). Wspomniane obserwacje wskazują, że przynajmniej w części zmienność mtDNA odpowiada za dysfunkcję mitochondriów i fenotyp AD na poziomie komórkowym (Swerdlow i wsp., 2010).

Za udziałem mitochondriów w etiopatogenezie AD przemawiają też dane, pokazujące, że poza zaawansowanym wiekiem, jednym z najważniejszych czynników ryzyka AD jest dodatni wywiad rodzinny w kierunku tej choroby (Farrer i wsp., 1997). Fakt posiadania matki z AD zwiększa ryzyko zachorowania dzieci w stopniu znacznie większym niż posiadanie ojca chorego na AD (Edland i wsp., 1996; Honea i wsp., 2010; Mosconi i wsp., 2009; Debette i wsp., 2009). Badania FDG-PET przeprowadzone w grupie zdrowych pod względem poznawczym osób, których matki chorowały na LOAD, wykazały, że te osoby mają obniżony metabolizm glukozy w tych samych obszarach mózgu, co chorzy na AD, w porównaniu z osobami posiadającymi ojca chorego na AD, oraz chorymi bez historii rodzinnej (Mosconi i wsp., 2009). Ponadto, u osób bez zaburzeń poznawczych, których matka chorowała na AD, zauważono zmniejszoną objętość istoty szarej w obszarach mózgu atakowanych przez AD, gorsze wykonanie testów neuropsychologicznych i zwiększone odkładanie A $\beta$  (Honea i wsp., 2010; Mosconi i wsp., 2010; Debette i wsp., 2009).

Wyższe ryzyko zachorowania na AD u potomków kobiet z AD sugeruje udział czynnika genetycznego. Wydaje się, że wspomniane ryzyko nie jest związane z chromosomem X, gdyż choroby recesywne sprzężone z chromosomem X są przekazywane z matek na synów, podczas gdy córki stanowią nosicielki zmiany genowej i nie rozwijają objawów choroby. Z kolei choroby o dziedziczeniu dominującym, sprzężone z chromosomem X charakteryzują się tym, że obie płcie wykazują objawy choroby, ale u mężczyzn ma ona znacznie cięższy przebieg (Bal i Mazurczak, 2008).

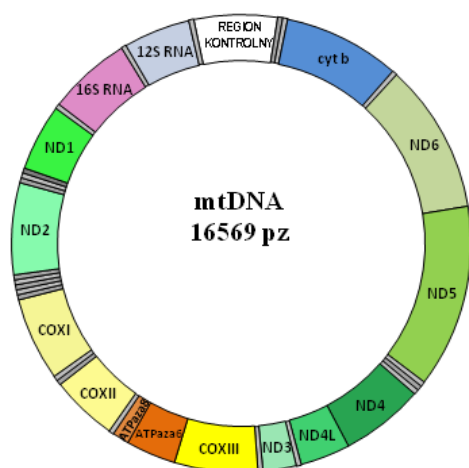
Jednak w AD nie odnotowano żadnego z tych wzorców dziedziczenia ani opisywanych wyżej różnic w przebiegu choroby u mężczyzn i kobiet. O roli zmian zlokalizowanych na chromosomie X

nie przekonują także badania sprzężeń (Bettens i wsp., 2010). Niewykluczone, że pewną rolę w AD mogą odgrywać zmiany epigenetyczne, np. piętnowanie genomowe czy narażenie na pewne czynniki wewnątrzmaciczne w trakcie ciąży. Przytoczone wyżej badania FDG-PET oraz dane z modeli cybrydowych wspierają hipotezę, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów w AD mogą być determinowane obecnością zmian w mitochondrialnych genach podjednostek łańcucha oddechowego bądź w funkcjonalnych sekwencjach mtDNA. Cybrydy zawierające mtDNA od osób, których matki chorowały na AD wykazywały niższą aktywność COX niż cybrydy z mtDNA od dzieci ojców z AD (Davis i wsp., 1997).

Na podstawie przedstawionych powyżej danych wysunięto hipotezę, że zmiany w mtDNA przyczyniają się do zaburzenia metabolizmu w przebiegu AD.

#### 1.2.4.1 Mitochondrialny DNA

Każde mitochondrium zawiera przeciętnie 4-10 kopii dwuniciowych cząsteczek mtDNA. W odróżnieniu od jądrowego DNA, mtDNA jest dziedziczony po matce, nie zawiera intronów i do jego powielania dochodzi niezależnie od podziałów komórkowych. MtDNA liczy 16569 nt, zgodnie ze standardem dla sekwencji mtDNA człowieka. Standard ten wprowadzono w 1981 r. (tzw. *Cambridge Reference Sequence*) (Anderson i wsp., 1981) i po kilku poprawkach (Andrews i wsp., 1999) stanowi on obowiązującą sekwencję porównawczą (GenBank NC\_012920, *revised Cambridge Reference Sequence*, rCRS).



**Ryc. 3. Schemat organizacji mitochondrialnego DNA (mtDNA) z zaznaczonym regionem kontrolnym oraz sekwencjami kodującymi geny oraz tRNA i rRNA mitochondrialne.** Dla przejrzystości fragmenty sekwencji mtDNA kodujące tRNA nie zostały podpisane, oznaczono je szarym kolorem.

MtDNA koduje 13 podjednostek łańcucha oddechowego oraz 2 rRNA i 22 tRNA (Ryc. 3). Pozostałe podjednostki łańcucha oddechowego oraz ok. 1500 innych białek mitochondrialnych są kodowane przez nDNA (Wallace i Fan, 2009). Zatem składanie podjednostek łańcucha oddechowego w kompleksy, wydajność przemian metabolicznych oraz poziom wytwarzanych wolnych rodników, zależą od podwójnej kontroli genetycznej. Zmienność genomu jądrowego i mitochondrialnego, może mieć kluczowe znaczenie dla wyżej wymienionych procesów.



### 1.2.4.2 Region kontrolny

MtDNA zawiera region o długości ok. 1122 pz, zlokalizowany pomiędzy pozycjami nukleotydowymi 16024 i 576, który choć nie koduje białek ani RNA, jest istotny dla procesów powielania sekwencji mitochondrialnego genomu (por. Ryc. 3). To tzw. region kontrolny (*control region*, RK), inaczej nazywany pętlą D (*Displacement loop*). Zawiera sekwencje regulatorowe, m.in. promotory transkrypcji z nici lekkiej (*light stand*, L) i ciężkiej (*heavy stand*, H), a także promotor replikacji nici H. RK jest bogaty w zmiany sekwencji, które występują z częstością ok. 10 razy wyższą niż w części kodującej mtDNA (van Oven i Kayser, 2008). RK zawiera trzy regiony hiperzmiennie, HVSI, HVSII, HVSIII, charakteryzujące się szczególnie wysoką polimorficznością i zawierające mutacyjne miejsca *hotspot*.

### 1.2.4.3 mtDNA mutuje częściej niż nDNA

Wyjątkową podatność mtDNA na uszkodzenia oksydacyjne warunkuje nie tylko lokalizacja w pobliżu głównego źródła wolnych rodników – łańcucha oddechowego, ale również brak nawinięcia na histony i brak rekombinacji. Co więcej, uszkodzenia oksydacyjne usuwane są wolniej i mniej skutecznie niż z nDNA (Yakes i van Houten, 1997). Przyczynia się to do większej częstości mutacji w mtDNA w porównaniu z nDNA.

Uważa się, że stale podwyższony poziom wolnych rodników wpływa negatywnie na funkcje mitochondriów oraz znacząco oddziałuje na proces starzenia (Wallace i Fan, 2009). Jednak dyskusji poddawana jest hipoteza samonapędzających się uszkodzeń w mtDNA, które upośledzając fosforylację oksydacyjną, miałyby prowadzić do powstawania następnych zmian itd. (Kujoth i wsp., 2005; Trifunovic i wsp., 2005; Tranah i wsp., 2010).

Podobnie jak w procesie starzenia się, w przebiegu AD dochodzi do gromadzenia się mutacji somatycznych<sup>4</sup> w mtDNA, szczególnie w tkankach postmitotycznych. Mutacje mogą być obecne we wszystkich kopiach mtDNA (homoplazmia) bądź występują w postaci heteroplazmatycznej<sup>5</sup>. Liczba cząsteczek mtDNA zawierających mutację somatyczną (albo wiele różnych mutacji) musi osiągnąć pewien krytyczny poziom w komórce, aby doszło do zmian funkcjonalnych, czyli kiedy niezmutowane mtDNA nie będą już mogły skompensować efektu wywieranego przez mutację/e (Gilkerson, 2009). Krytyczny poziom heteroplazmii dla funkcjonowania mitochondriów zależy od rodzaju tkanki – jest on niższy w tkankach uzależnionych od metabolizmu tlenowego, takich jak np. mózg.

Zarówno mutacje niesynonimiczne regionu kodującego, jak również mutacje w RK, mogą wpływać na funkcje mitochondriów (Suissa i wsp., 2009). Z badań na modelach zwierzęcych wiadomo, że mutacje somatyczne związane ze stopniowym pogarszaniem się funkcji mitochondriów, przyspieszają starzenie

<sup>4</sup> Mutacja somatyczna – mutacja DNA komórek somatycznych, nieobecna w komórkach linii płciowej.

<sup>5</sup> Heteroplazmia – występowanie dwóch lub więcej wariantów cząsteczek mtDNA (czyli zawierających różne zmiany w sekwencji mtDNA). Występuje na poziomie komórki, organelli (mitochondrium) bądź tkanki. Wyróżnia się dwa rodzaje heteroplazmii: punktową (dotyczącą pojedynczego nukleotydu) oraz heteroplazmię długości (dotyczącą traktu nukleotydów).

---

organizmu (Kujoth i wsp., 2005; Trifunovic i wsp., 2004, 2005). Ponieważ najważniejszym pozagenetycznym czynnikiem ryzyka AD jest zaawansowany wiek, jedna z hipotez postuluje, że dysfunkcja mitochondriów obserwowana w przebiegu AD wynika z gromadzenia uszkodzeń w mtDNA. Efekt ten towarzyszy naturalnemu procesowi starzenia, jednak może być spotęgowany specyficznymi dla AD czynnikami ryzyka (Coskun i wsp., 2004). Istotnie, część badaczy opisuje, że częstość mutacji w mtDNA u chorych przewyższa tę związaną z procesem starzenia się (Chang i wsp., 2000; Coskun i wsp., 2004), ale nie wszyscy stwierdzają różnice w częstości mutacji somatycznych w mtDNA (Chinnery i wsp., 2001; Lin i wsp., 2002). Wydaje się, że mutacje somatyczne nie wpływają znacząco na fenotyp cybryd zawierających mtDNA chorych na AD w porównaniu z cybrydami niosącymi mtDNA zdrowych osób. Stąd nie odgrywają one raczej dominującej roli w etiopatogenezie AD.

#### **1.2.4.4 Haplogrupy mitochondrialne**

Porównanie sekwencji dowolnego mtDNA z rCRS ujawnia warianty, którymi sekwencja badana różni się od referencyjnej. Układ wspomnianych wariantów tworzy haplotyp mtDNA. Osoby należące do jednej grupy etnicznej, spokrewnionej w linii matczynej, mają zbliżone haplotypy, różniące się tylko niewieloma wariantami. Wspólne dla danej grupy polimorfizmy mtDNA tworzą tzw. haplogrupę mitochondrialną.

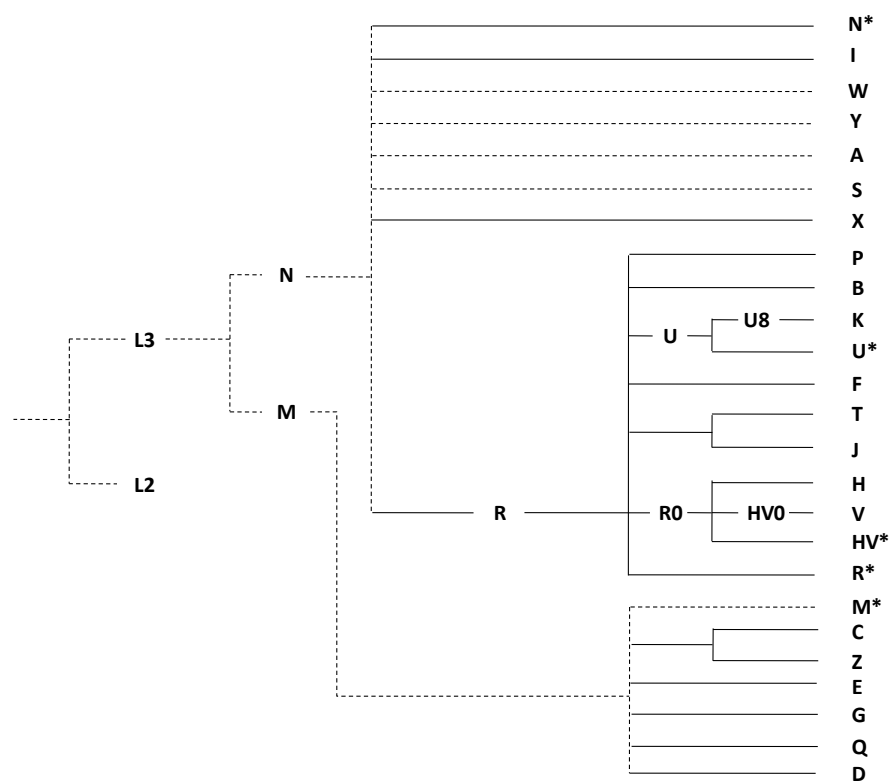
Powstawanie haplogrup towarzyszyło migracjom pierwotnych populacji ludzkich z Afryki do Euroazji, które rozpoczęły się ok. 70 tys. lat temu. Biorąc pod uwagę fundamentalne znaczenie genomu mitochondrialnego dla funkcjonowania łańcucha oddechowego, postawiono hipotezę, że istnieją haplogrupy wpływające na wydajność fosforylacji oksydacyjnej, pośrednio sprzyjające adaptacji do warunków klimatycznych i dostępności pokarmu (Ruiz-Pesini i wsp., 2004; Kivisild i wsp., 2006; Wallace, 2005). Wspomniana hipoteza tłumaczy zróżnicowanie geograficzne częstości występowania poszczególnych haplogrup. Trzy główne grupy etniczne (Afrykańczycy, Azjaci oraz rdzenni Amerykanie, Europejczycy) należą do różnych haplogrup, odzwierciedlających zróżnicowanie sekwencji mtDNA (Torroni i wsp., 1996). Do określenia haplogrup charakterystycznych dla populacji polskiej, jak i dla pozostałych rdzennych Europejczyków oraz osób zamieszkujących Stany Zjednoczone, Kanadę, wywodzących się z Europy stosuje się dość niezręczny i upraszczający termin – haplogrupy charakterystyczne dla populacji kaukaskiej (*Caucasians*). Pamiętając o niedoskonałości terminu “populacja kaukaska” (Bhopal i Donaldson, 1998; Parson i Bandelt, 2007), w niniejszej pracy będzie on jednak stosowany, gdyż, niestety, brak bardziej adekwatnego zamiennika.

W populacji kaukaskiej wyodrębniono 9 najczęściej występujących haplogrup: H, I, J, K<sup>6</sup>, T, U, V, W oraz X, które należą odpowiednio do klasterów HV, KU, IWX, JT (Torroni i wsp., 1996; Finnilä i wsp., 2001). Wywodzą się z linii N, która powstała ok. 70 tys. lat temu i pochodzi z afrykańskiej linii L3 (Ryc. 4) (Lakatos i wsp., 2010). Uważa się, że z L3 wywodzą się wszyscy

---

<sup>6</sup> K stanowi podhaplogrupę haplogrupy U, jednak zwyczajowo w literaturze często nadal wymienia się ją jako równorzędną haplogrupę, stąd w niniejszej pracy postąpiono podobnie.

rdzenni Europejczycy (Malyarchuk i wsp., 2002), a ponad 95% z nich należy do wspomnianych dziewięciu haplogrup mitochondrialnych charakterystycznych dla populacji kaukaskiej. Fragment drzewa filogenetycznego haplogrup występujących w populacji kaukaskiej przedstawiono na Ryc. 4.



**Ryc. 4. Fragment drzewa filogenetycznego mitochondrialnych haplogrup, występujących w populacji kaukaskiej (na podstawie van Oven i Kayser, 2008).** Dla przejrzystości na schemacie uwzględniono tylko główne gałęzie drzewa i nie dokonano rozróżnienia na podhaplogrupy i podtypy. Nie przedstawiono “korzeni” drzewa – szeregu haplogrup charakterystycznych dla populacji afrykańskiej (L1-L6), co zaznaczono jedynie przerywaną linią. Uwzględniono jedynie haplogrupę L3, z której wywodzą się makrohaplogrupy M, N i R, oraz L2. Nazwy haplogrup, przy których postawiono symbol (\*) obejmują dalsze linie poza przedstawionymi na rycinie (np. N\* oznacza linie N5, N12, N13, N14, N21, N22).

Poszczególne haplogrupy dzielą się na podhaplogrupy, a te na podtypy, co odzwierciedla wysoką zmienność mtDNA. Do ich klasyfikacji wykorzystuje się informacje o zmienności sekwencji nie tylko w RK, ale także w regionie kodującym mtDNA. W niniejszej pracy stosowano rekomendowany system nazewnictwa haplogrup i dalszych ich podjednostek według baz danych MITOMAP, <http://www.mitomap.org/MITOMAP>, mtDNAMANAGER, <http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>, oraz PhyloTree, <http://www.phylotree.org/>.

Zróźnicowanie haplogrup znajduje zastosowanie w medycynie sądowej, antropologii, genetyce populacyjnej (np. w badaniach migracji czy powstawania języków), a także w analizie czynników ryzyka wielu chorób powiązanych ze zmianami w metabolizmie. Wydaje się, że kombinacja polimorfizmów tworzących haplogrupę, z których każdy osobno jest nieszkodliwy, może wpływać na podatność na choroby wieloczynnikowe, ale także cechy związane z osiągnięciem długowieczności czy adaptacją do warunków klimatycznych (Wallace i wsp., 2003; Wallace, 2005).

Dotychczas nie rozstrzygnięto znaczenia zmian konstytutywnych w mtDNA w patogenezie AD. W Tabeli 1 zestawiono badania, w których wykryto związek zmienności mtDNA z zachorowaniem na AD w populacji kaukaskiej. Eksponuje ona różnice nie tylko w uzyskanych wynikach, ale także w pochodzeniu i liczebności badanych grup.

**Tabela 1.** Związek polimorfizmów mtDNA, haplogrup mitochondrialnych oraz tworzonych przez nie klasterów z ryzykiem choroby Alzheimer'a (LOAD) w populacji kaukaskiej. Zestawiono jedynie te badania, w których wykryto związek pomiędzy zmiennością mtDNA a zachorowaniem na AD.

Polimorfizm/ Haplogrupa/ Klaster haplogrup	Wpływ na ryzyko LOAD	Populacja	LOAD/ Grupa kontrolna (N/N)	Piśmiennictwo
<b>m.4336T&gt;C</b>	↑	populacja kaukaska (USA)*	62/125	Shoffner i wsp., 1993
	↑	niemiecka	28/100	Egensperger i wsp., 1997
	↑	populacja mieszana (USA)**	72/296	Hutchin i Cortopassi, 1995
	↓	populacja kaukaska (USA)	155/105	Wragg i wsp., 1995
<b>m.11467A&gt;G</b>	↑	ADNI***	170/188	Lakatos i wsp., 2010
<b>m.10398A&gt;G</b>	↑ u mężczyzn	populacja kaukaska (USA)	989/328	van der Walt i wsp., 2004
<b>m.12308A&gt;G</b>	↓ u kobiet	populacja kaukaska (USA)	989/328	van der Walt i wsp., 2004
	↑	ADNI	170/188	Lakatos i wsp., 2010
<b>m.12372G&gt;A</b> <b>m.9698C&gt;T</b> <b>m.16270C&gt;T</b>	↑	ADNI	170/188	Lakatos i wsp., 2010
<b>HV</b>	↑	polska	222/252	Maruszak i wsp., 2009a
<b>H</b>	↑	irańska	30/100	Fesahat i wsp., 2007
<b>H5</b>	↑	mieszkańcy północnych i środkowych Włoch	936/776	Santoro i wsp., 2010
<b>J</b>	↑	Kanadyjczycy pochodzenia francuskiego	69/83	Chagnon i wsp., 1999
<b>K</b>	neutralizuje wpływ <i>APOE4</i>	włoska	213/179	Carrieri i wsp., 2001
<b>T</b>	↓	Kanadyjczycy pochodzenia francuskiego	69/83	Chagnon i wsp., 1999
<b>U</b>	neutralizuje wpływ <i>APOE4</i>	włoska	213/179	Carrieri i wsp., 2001
	↑ u mężczyzn, ↓ u kobiet	populacja kaukaska (USA)	989/328	van der Walt i wsp., 2004
	↑	irańska	30/100	Fesahat i wsp., 2007
	↑	ADNI	170/188	Lakatos i wsp., 2010

↑ oznacza wzrost, ↓ spadek ryzyka zachorowania na AD; \* ang. *European Caucasians*; \*\*Populacja mieszana oznacza, że znajdowali się w niej zarówno Azjaci, Afrykańczycy, jak i osoby z populacji kaukaskiej; \*\*\*ADNI - *Alzheimer's disease Neuroimaging Initiative*

Należy podkreślić, że nie wszyscy badacze stwierdzili asocjację haplogrup czy polimorfizmów mitochondrialnych z AD (Chinnery i wsp., 2000; Pyle i wsp., 2005; Elson i wsp., 2006; Mancuso i wsp., 2007; Krüger i wsp., 2009). Związek polimorfizmów i haplogrup mitochondrialnych z patogenezą AD badano także dla populacji innych niż kaukaska, np. w populacji japońskiej, wykazując związek haplogrupy G2a z ryzykiem zachorowania na AD (Takasaki i wsp., 2009).

Biorąc pod uwagę dane o wpływie polimorfizmów mtDNA i/lub mitochondrialnych haplogrup na funkcje mitochondriów, starzenie oraz funkcje poznawcze, a także uwzględniając dotychczasowe

doniesienia, pokazujące identyfikację specyficznych dla danej populacji zmian w mtDNA związanych z zachorowaniem na AD, w niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ zmienności mtDNA na ryzyko AD w populacji polskiej. Szczególną uwagę poświęcono zbadaniu asocjacji haplogrup związanych ze sprzężaniem-rozprężaniem fosforylacji oksydacyjnej z ryzykiem AD, uwzględniając hipotezę postawioną przez prof. D. Wallace'a wraz ze swoją grupą badawczą (Wallace i wsp., 2003, Wallace, 2005; Ruiz-Pesini i wsp., 2004).

#### **1.2.4.5 Haplogrupy mitochondrialne a sprzężanie-rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej**

Fosforylacja oksydacyjna jest uzależniona od pompowania protonów przez kompleksy oddechowe I, III i IV poza matriks mitochondrialną oraz od ich przepływu przez syntazę ATP. Sprzężanie zachodzi wówczas, gdy wszystkim elektronom przenoszonym w łańcuchu oddechowym towarzyszy powstawanie cząsteczek ATP. Rozprężanie jest zaś rezultatem przecieku protonów do matriks, powoduje rozpraszanie siły protomotorycznej, redukuje liczbę protonów płynących przez syntazę ATP, zmniejszając ilość wytwarzanego ATP, ale także zmniejszając ilość wolnych rodników. Część energii z utleniania substratów zostaje niespożytkowana i uwolniona w postaci ciepła. Tym samym, rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej jest powiązane ze wzmożoną produkcją ciepła, kosztem mniejszej produkcji ATP (Mishmar i wsp., 2003; Ruiz-Pesini i wsp., 2004).

Wallace i wsp. (2003) uszeregowali haplogrupy specyficzne dla populacji kaukaskiej od tych związanych z fenotypem sprzęgającym do tych powiązanych z fenotypem najbardziej rozprężającym fosforylację oksydacyjną (patrzac od lewej do prawej; U\* oznacza pozostałe podhaplogrupy U poza U4 i U5a1): H > T = J > U\* > U4 = U5a1 > K. Postulują oni, że w ewolucji doszło do pozytywnej selekcji haplogrup mitochondrialnych związanych z częściowym rozprężaniem fosforylacji oksydacyjnej (U4, U5a, K, J, T), ponieważ mutacje w kodowanych przez mtDNA podjednostkach cytochromu b (*cytochrome b*, CYTB) i syntazy ATP (*ATP synthase F0 subunit 6*, ATP6) pozwoliły na adaptację do niższych temperatur (Mishmar i wsp., 2003; Ruiz-Pesini i wsp., 2004; Balloux i wsp., 2009; Montiel-Sosa i wsp., 2006). Wspomniane zmiany mogą wpływać na wydajność fosforylacji oksydacyjnej, a zatem na produkcję ATP oraz powiązane z tym wytwarzanie wolnych rodników i ciepła (Montiel-Sosa i wsp., 2006; Wallace, 2005; De Benedictis i wsp., 1999; Arning i wsp., 2010). Dla przykładu, dwie główne podhaplogrupy J, J1 i J2, niosą warianty w CYTB (por. Tab. 2), powodujące podstawienie konserwowanych ewolucyjnie aminokwasów i zmieniające miejsce wiązania koenzymu Q przez kompleks III łańcucha oddechowego (Wallace, 2005).

W różnych regionach geograficznych korzystne mogły być inne optima wydajności fosforylacji oksydacyjnej, a tym samym inne haplogrupy mtDNA mogły być faworyzowane przez dobór naturalny, co w rezultacie doprowadziło do zróżnicowanego rozmieszczenia geograficznego mitochondrialnych haplogrup (Balloux i wsp., 2009; Mishmar i wsp., 2003; Ruiz-Pesini i wsp., 2004). Według Wallace i wsp. (2003) podczas gdy w przeszłości ewolucyjnej haplogrupy mitochondrialne ułatwiły adaptację człowieka do różnych warunków klimatycznych, obecnie stanowią czynniki ryzyka chorób występujących powszechnie np. chorób neurodegeneracyjnych czy cukrzycy (Wallace,

2005; Ruiz-Pesini i wsp., 2004; Mishmar i wsp., 2003). Haplogrupy związane z fenotypem sprzęgania fosforylacji oksydacyjnej – zgodnie z powyższą hipotezą - sprzyjają większemu ryzyku chorób neurozwyrodnieniowych (Wallace i wsp., 2003; Wallace, 2005).

**Tabela 2.** Polimorfizmy w mtDNA, uczestniczące w tworzeniu fenotypu częściowego rozprzęgnięcia fosforylacji oksydacyjnej wg Montiel-Sosa i wsp., 2006, Khusnutdinova i wsp., 2008; Ruiz-Pesini i wsp., 2004.

Haplogrupa/podhaplogrupa	Polimorfizm mtDNA	Locus
<b>K</b>	14798T>C	<i>CYTB</i>
	9055G>A	<i>ATP6</i>
<b>U4</b>	15693T>C	<i>CYTB</i>
<b>U5a</b>	14793A>G	<i>CYTB</i>
<b>U5a1</b>	15218A>G	<i>CYTB</i>
<b>J, T</b>	15452C>A	<i>CYTB</i>
<b>J1c</b>	14798T>C	<i>CYTB</i>
<b>J2</b>	15257G>A	<i>CYTB</i>

Dotychczas w AD nie badano wpływu haplogrup związanych z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej na ryzyko zachorowania. Tymczasem stwierdzono, że haplogrupy powiązane z częściowym rozprzęgnięciem metabolizmu stanowią czynnik protekcyjny przed rozwojem choroby Parkinsona (Khusnutdinova i wsp., 2008; Gawęda-Walerych i wsp., 2010).

### 1.2.5 Rola zmian sekwencji genów jądrowych w patogenezie AD

Badania prowadzone z wykorzystaniem modeli zwierzęcych pokazują, że oddziaływania pomiędzy genomem jądrowym i mitochondrialnym mają ważne znaczenie dla funkcji poznawczych (Roubertoux i wsp., 2003). Stąd poza zmiennością mtDNA przedmiotem niniejszej rozprawy jest także analiza zmienności kilku genów jądrowych, w tym bezpośrednio zaangażowanych w funkcjonowanie i biogenezę mitochondriów.

Biorąc pod uwagę obecność dysfunkcji mitochondriów w przebiegu AD, wybrano do analizy polimorfizmy w genach kodujących białka bezpośrednio zaangażowane w kontrolowanie ilości mtDNA oraz wpływające na homeostazę energetyczną komórki (gen kodujący mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A, *TFAM* oraz gen koaktywatora 1 $\alpha$  receptorów- $\gamma$  aktywowanych przez proliferatory peroksyosomów, *PGC-1 $\alpha$* ). Ponadto, postanowiono uwzględnić w badaniach także wybrane warianty genu odpowiedzialnego za homeostazę żelaza (gen hemochromatozy, *HFE*), a także zmienność genu odpowiedzialnego za zmiany konformacji tau i A $\beta$ PP, biorącego też udział w apoptozie (gen izomerazy *cis-trans* peptydylo-prolylowej 1, oddziałującej z NIMA, *PINI*). W badaniach uwzględniono także wpływ allelu *APOE4*.

#### 1.2.5.1 Wpływ zmienności polimorficznej *APOE* na ryzyko AD

Apolipoproteina E (*APOE*) pełni zasadniczą rolę w naprawie i funkcjonowaniu neuronów (Mahley i wsp., 2006). Posiada trzy izoformy, *APOE2*, *APOE3*, *APOE4* (kodowane odpowiednio

przez trzy allele, *APOE2*, *APOE3*, *APOE4*<sup>7</sup>). Allel *APOE4* jest najsilniejszym znanym genetycznym czynnikiem ryzyka AD, jego nosicielstwo nie jest jednak ani niezbędne, ani wystarczające do zachorowania na AD (Corder i wsp., 1993; Strittmatter i wsp., 1993; Seshadri i wsp., 2010; Sleegers i wsp., 2010). Ponadto, w niektórych populacjach wydaje się wywierać słabszy wpływ bądź wcale nie wpływać na ryzyko AD (Farrer i wsp., 1997; Kalaria i wsp., 2008; Mayeux, 2003; Tang i wsp., 1998).

Istnieje szereg hipotez dotyczących udziału *APOE4* w patogenezie AD. Jedna z nich zakłada, że wpływ *APOE4* może wynikać z mniejszych właściwości antyoksydacyjnych w porównaniu z pozostałymi izoformami *APOE* (Kharrazi i wsp., 2008; Miyata i Smith, 1996), z uwagi na różną ilość reszt cysteinowych<sup>8</sup>. *APOE4* jest wiązany także z zaburzeniem metabolizmu glukozy zarówno u chorych na AD, jak i u zdrowych nosicieli (Reiman i wsp., 2004).

Z drugiej strony, Riddell i wsp. (2008) wykazali, że myszy eksprymujące ludzką izoformę *APOE4* wykazują niższy poziom całkowitego *APOE* w porównaniu z myszami eksprymujące pozostałe dwa ludzkie warianty *APOE*. Ponadto, izoforma *APOE4* jest preferencyjnie i szybciej degradowana niż *APOE3*. Tymczasem, wiele danych wskazuje na rolę *APOE* w usuwaniu i degradacji  $A\beta$ . *APOE4*, spośród pozostałych izoform, najmniej efektywnie transportuje  $A\beta$  przez barierę krew-mózg (Deane i wsp., 2008), a nosiciele *APOE4* charakteryzuje większa ilość złogów amyloidowych (Riddell i wsp., 2008; Mahley i wsp., 2006). Sugeruje to, że niski poziom *APOE* u nosicieli allelu *APOE4* upośledza pozbywanie się złogów  $A\beta$ , przyczyniając się tym samym do ich akumulacji (Riddell i wsp., 2008).

Ponadto, stwierdzono, że *APOE* obecne w neuronach ulega proteolizie, a *APOE4* jest łatwiej przecinane niż pozostałe izoformy (Chang i wsp., 2005; Mahley i wsp., 2006). Następnie fragmenty *APOE* gromadzą się w mitochondriach i wpływają na ich funkcje oraz dynamikę (Chang i wsp., 2005; Mahley i wsp., 2006; Nakamura i wsp., 2009). Fragmenty *APOE4* wiążą się m.in. do izoformy 1 podjednostki 4 oksydazy cytochromowej (COX IV 1) i wpływają na aktywność kompleksu III i IV łańcucha oddechowego (Nakamura i wsp., 2009).

Przedstawione dane dotyczące wpływu *APOE4* na różne aspekty fizjologii AD, także na funkcjonowanie mitochondriów, wskazują na konieczność uwzględnienia zmienności *APOE* w przeprowadzonych badaniach genetycznych.

### 1.2.5.2 *TFAM*

Mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (*mitochondrial transcription factor A*, *TFAM*) jest jednym z najważniejszych regulatorów funkcjonowania mitochondriów - uczestniczy w utrzymywaniu prawidłowej ilości kopii mtDNA, jest także niezbędny do inicjacji transkrypcji i replikacji mtDNA (Kang i wsp., 2007). *TFAM* wiąże się do promotorów transkrypcji w obrębie RK mtDNA, a także

<sup>7</sup> określane także jako *APOE2*,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$

<sup>8</sup> Izofomy *APOE* różnią się jednym lub dwoma aminokwasami w pozycji 112 i/lub 158: *APOE2* (Cys112, Cys158), *APOE3* (Cys112, Arg158), *APOE4* (Arg112, Arg158)

---

opłascza mtDNA, tworząc wraz z innymi białkami<sup>9</sup> nukleoid, zapewniający mu odpowiednią konformację przestrzenną i możliwość replikacji oraz pełniący funkcję ochronną (Gilkerson, 2009). Rola TFAM polega także na indukowaniu naprawy uszkodzeń oksydacyjnych w mtDNA (Sörensen i wsp., 2001). Nadekspresja TFAM u myszy chroni je przed uszkodzeniami oksydacyjnymi indukowanymi rotenonem bądź A $\beta$ , natomiast traktowanie komórek A $\beta$  zmniejsza ekspresję TFAM (Hong i wsp., 2007; Xu i wsp., 2009). Ponadto, nokaut *TFAM* w mysich neuronach indukuje neurodegenerację i masywną śmierć komórek w hipokampie i korze nowej (Sörensen i wsp., 2001). Podane przykłady wskazują, że wewnątrzkomórkowy poziom TFAM może wpływać na patogenezę AD.

Gen *TFAM* jest konserwowany ewolucyjnie, a jego nokaut jest letalny (Belin i wsp., 2007; Kang i wsp., 2007). *TFAM* jest położony w chromosomie 10q21.1. Region 10q w analizie sprzężeń okazał się sprzężony z AD, a *TFAM* został jednym z genów kandydatów, zarówno pozycyjnych, jak i funkcjonalnych dla AD (Bertram i wsp., 2000; Myers i wsp., 2000). Także niedawno przeprowadzona metaanaliza wykazała, że *TFAM* jest genem potencjalnie związanym z rozwojem AD (Bertram i wsp., 2007).

Coraz więcej danych wskazuje, że zmienność *TFAM* wpływa na ryzyko AD (Laumet i wsp., 2010). Na przykład, dwa polimorfizmy *TFAM* są związane z podatnością na AD - niesynonimiczna zmiana rs1937 (c.35G>C, Ser12Thr) w eksonie 1 oraz polimorfizm rs2306604 (c.441+113G>A) w intronie 4 (Alvarez i wsp., 2008; Günther i wsp., 2004; Belin i wsp., 2007). Należy podkreślić, że poza zmianami w sekwencji *TFAM*, ważną rolę mogą mieć także mutacje powstałe w miejscach wiązania się TFAM do cząsteczki mtDNA (Coskun i wsp., 2004). W związku z tym postanowiono sprawdzić częstości polimorfizmów rs1937 oraz rs2306604 w badanej populacji oraz wykonać szczegółową analizę zmienności regionu kontrolnego w miejscach wiązania się TFAM do cząsteczki mtDNA.

### **1.2.5.3 PGC-1 $\alpha$**

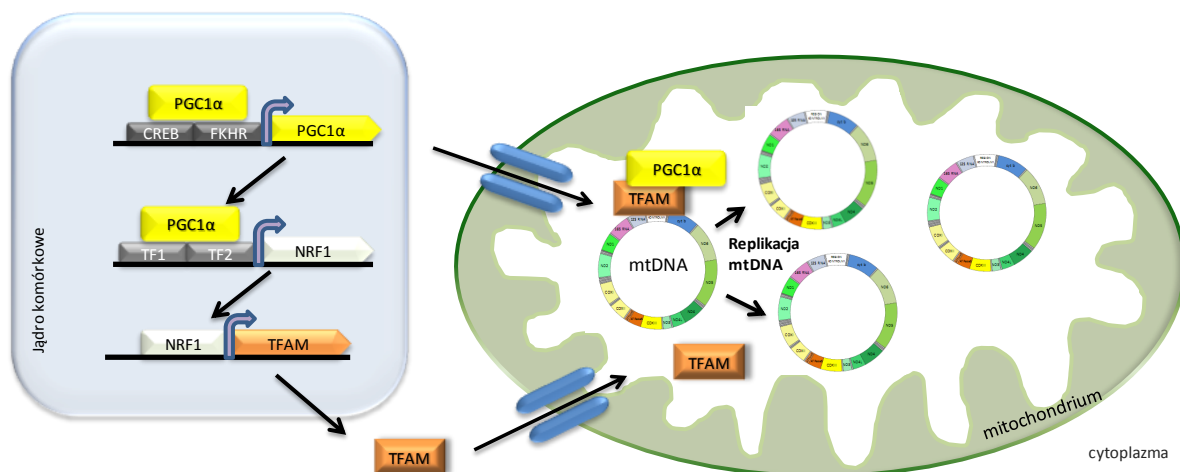
Koaktywator 1 $\alpha$  receptorów- $\gamma$  aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* , PGC-1 $\alpha$ , PGC1A, PPARGC1A) jest nadrzędnym regulatorem równowagi energetycznej komórki (Rohas i wsp., 2007). Wysoki poziom PGC-1 $\alpha$  występuje w tkankach o dużej aktywności metabolicznej, np. w mózgu (Finck i Kelly, 2006). PGC-1 $\alpha$  jest zbudowane z kilku domen funkcjonalnych, umożliwiających pełnienie roli koaktywatora transkrypcyjnego, współpracującego z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi w regulacji biogenezy mitochondriów w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska komórkowego (Wareski i wsp., 2009). PGC-1 $\alpha$  koaktywuje m.in. ekspresję jądrowych czynników transkrypcyjnych *NRF1* i *NRF2*, które następnie stymulują ekspresję *TFAM*. W ten sposób PGC-1 $\alpha$  wpływa na zwiększenie liczby cząsteczek mtDNA (por. Ryc. 5), co prowadzi do wzrostu liczby mitochondriów (Viña i wsp., 2009; Wu i wsp., 1999). *NRF1* i *NRF2* kontrolują także ekspresję innych genów jądrowych, kodujących

---

<sup>9</sup> TFAM jest głównym białkowym składnikiem nukleoidu. W jego skład wchodzi także: helikaza Twinkle, mitochondrialna polimeraza  $\gamma$ , mtSSB, prohibityna 1 i 2 (Gilkerson i wsp., 2009).



podjednostki łańcucha oddechowego (Finck i Kelly, 2006). Dotychczas przyjmowano, że PGC-1 $\alpha$  jest zlokalizowane w jądrze komórkowym, jednak ostatnie doniesienia wskazują, że występuje również w mitochondriach, gdzie m.in. uczestniczy w wiązaniu się TFAM do regionu kontrolnego (Aquilano i wsp., 2010).



**Ryc. 5. PGC-1 $\alpha$  jest nadrzędnym regulatorem replikacji mtDNA i ekspresji genów mitochondrialnych. Na rycinie pokazano etap aktywacji ekspresji jądrowych czynników transkrypcyjnych *NRF1* i *NRF2*, które z kolei stymulują ekspresję *TFAM*. Białko TFAM jest transportowane do mitochondriów, gdzie bierze udział w tworzeniu nukleoidów z mtDNA oraz jest czynnikiem niezbędnym w replikacji i transkrypcji mtDNA. Powielenie cząsteczek mtDNA pozwala m.in. na powstanie nowych mitochondriów. PGC-1 $\alpha$  jest poza jądrem także obecne w mitochondriach. Ponadto, PGC-1 $\alpha$  jest aktywatorem własnej transkrypcji dzięki mechanizmowi sprzężenia zwrotnego. CREB- *cAMP-Response-Element-Binding Protein*, FKHR- *Forkhead transcription factor*; TF1- *transcription factor 1*; TF2- *transcription factor 2*; NRF1- *nuclear respiratory factor 1*; NRF2- *nuclear respiratory factor 2*; TFAM- *mitochondrial transcription factor A*.**

Ponadto, PGC-1 $\alpha$ , będąc koaktywatorem wielu genów zaangażowanych w funkcjonowanie łańcucha oddechowego, jednocześnie chroni komórkę przed wolnymi rodnikami, indukując odpowiedź antyoksydacyjną (St-Pierre i wsp., 2006). Stymuluje ekspresję genów enzymów zaangażowanych w detoksyfikację wolnych rodników oraz białek rozprzegających metabolizm, które rozpraszają gradient protonów w błonie, zmniejszając jej potencjał, co powoduje zmniejszenie wytwarzania wolnych rodników (St-Pierre i wsp., 2006). Natomiast rozprzeganie fosforylacji oksydacyjnej indukuje wzrost ekspresji PGC-1 $\alpha$ , a następnie wzrost ekspresji genów łańcucha oddechowego (Rohas i wsp., 2007). Nadekspresja PGC-1 $\alpha$  chroni komórki nerwowe przed stresem oksydacyjnym wywołanym toksynami mitochondrialnymi (St-Pierre i wsp., 2006). Z kolei myszy PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> wykazują zmiany typowe dla neurodegeneracji, szczególnie dotyczące okolic ruchowych (Leone i wsp., 2005).

Opisane powyżej właściwości PGC-1 $\alpha$  sugerują jego udział w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych, w tym w AD. Z ostatnich doniesień wynika, że progresji AD towarzyszy stopniowy spadek poziomu ekspresji *PGC-1 $\alpha$*  w hipokampach chorych, odwrotnie skorelowany z ilością blaszek amyloidowych (Qin i wsp., 2009). Natomiast zewnętrzne podawanie PGC-1 $\alpha$  neuronom z mysiego modelu AD sprzyjało nieamyloidogennemu cięciu A $\beta$ PP (Qin i wsp., 2009).

---

Podobnie jak w AD, w chorobie Huntingtona oraz w cukrzycy typu II dochodzi do obniżenia ekspresji PGC-1 $\alpha$  (Ling i wsp., 2004).

Stwierdzono ponadto związek polimorfizmu c.1444G>A (rs8192678, Gly482Ser) *PGC-1 $\alpha$*  (chr. 4p15.2) z poziomem jego ekspresji. Wspomniany polimorfizm znajduje się w eksonie 8. Zdrowi nosiciele przynajmniej jednego allelu Ser482 wykazują niższy poziom mRNA dla PGC-1 $\alpha$  w mięśniach w porównaniu z homozygotami pod względem allelu Gly482 (Ling i wsp., 2004). Co więcej, poziom PGC-1 $\alpha$  u nosicieli allelu Ser482 ulega stopniowemu obniżeniu wraz z procesem starzenia (Ling i wsp., 2004). Stwierdzono również, że Ser482 przyczynia się do mniej wydajnej koaktywacji czynników transkrypcyjnych (Deeb i Brunzell, 2009).

W badaniach asocjacyjnych allel Ser482 jest wiązany z szeregiem cech, m.in. z indeksem masy ciała (*body mass index*, BMI), otyłością brzuszną, a także z nadciśnieniem, cukrzycą typu II, insulinoopornością, itp. (Weng i wsp., 2010; Franks i wsp., 2007). Z kolei allel Gly482 jest wiązany z wybitnymi osiągnięciami sportowymi (Lucia i wsp., 2005). Biorąc pod uwagę dane przemawiające za tym, że cukrzyca typu II jest czynnikiem ryzyka AD oraz że w mózgach chorych obserwuje się zaburzenia metabolizmu i obniżony poziom PGC-1 $\alpha$ , postanowiono zbadać udział Gly482Ser w ryzyku zachorowania na AD.

#### **1.2.5.4 PIN1**

PIN1 (*peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1*) jest powszechnie występującą w komórkach izomerazą peptydylo-prolylową, należącą do rodziny parwulin. Zawiera domenę WW, wiążącą się z substratami PIN1, a także domenę katalityczną, która katalizuje izomeryzację *cis-trans* łańcuchów peptydowych, po stronie N-końca motywów zawierających ufosforylowaną serynę lub treoninę, poprzedzającą w łańcuchu prolinę, p(Ser/Thr)-Pro (Zhou i wsp., 1999). W ten sposób PIN1 wywołuje znaczące zmiany w strukturze białek, ich funkcji, wewnątrzkomórkowej lokalizacji i/oraz stabilności, odgrywając kluczową rolę w wielu szlakach komórkowych, m.in. w transporcie wewnątrzkomórkowym, przekazywaniu sygnałów, transkrypcji, cyklu komórkowym i apoptozie (Butterfield i wsp., 2006; Lu i wsp., 1999; Lu i wsp., 2002). Wśród jego substratów znajdują się m.in. cyklina D1, Cdc25, c-Jun, TP53, a także A $\beta$ PP i tau.

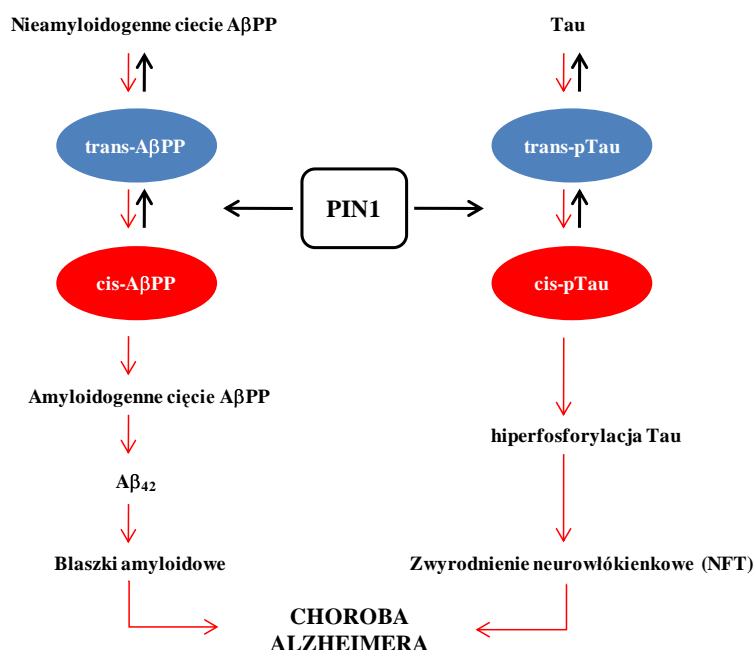
W mózgu ekspresja PIN1 jest trzy razy wyższa niż w pozostałych tkankach (Zhang i wsp., 2004). PIN1 jest zaangażowane m.in. w różnicowanie neuronów, podtrzymywanie ich normalnych funkcji i utrzymanie ich w stanie postmitotycznym. Ponadto, PIN1 jest obecne w błonie mitochondriów neuronów, wraz z białkami istotnymi dla apoptozy w komórkach nerwowych, BIM<sub>EL</sub> i kompleksem JIP3-JNK (Becker i Bonni, 2006). BIM<sub>EL</sub> jest głównym regulatorem apoptozy w neuronach (Becker i Bonni, 2007), także w przebiegu AD (Biswas i wsp., 2007). Oddziałując z tymi białkami PIN1 bierze udział w aktywacji szlaku apoptotycznego specyficznego dla neuronów (Becker i Bonni, 2006).

*PIN1* znajduje się w chromosomie 19p13.2, locus wiązany z ryzykiem zachorowania na LOAD (Butler i wsp., 2009). *PIN1* jest zbudowany z 4 eksonów i posiada kilka wariantów

splicingowych. Jego sekwencja jest wysoce konserwowana ewolucyjnie. *PIN1* jest jedynym znanym genem, którego nokaut w modelu mysim powoduje wystąpienie charakterystycznych dla AD zmian w tau i A $\beta$ PP (Pastorino i wsp., 2006). *PIN1* oddziałuje zarówno z A $\beta$ PP, jak i z tau. Sugeruje się, że poprzez wpływ na konformację obu białek, *PIN1* mógłby chronić przed powstaniem NFT i blaszek amyloidowych (Pastorino i wsp., 2006, Lu i wsp., 1999). W warunkach fizjologicznych *PIN1* dokonuje izomeryzacji motywu pThr231-Pro w ufosforylowanym tau, przywracając tau zdolność wiązania mikrotubul oraz sprzyjając jego defosforylacji i degradacji (Lu i wsp., 2002). *PIN1* wpływa również na konformację motywu pThr668-Pro w A $\beta$ PP. U chorych na AD A $\beta$ PP jest w znacznie wyższym stopniu ufosforylowane w tej pozycji. Wykazano, że zmiana konformacji pThr668-Pro z *trans* na *cis* sprzyja zmianie cięcia A $\beta$ PP na amyloidogenne. U osób zdrowych motyw ten jest odnajdywany przede wszystkim w konformacji *trans*, co faworyzuje z kolei nieamyloidogenne cięcia A $\beta$ PP, a tym samym niski poziom A $\beta$  (Pastorino i wsp., 2006).

W badaniach autopsyjnych stwierdzono obniżony poziom *PIN1* w hipokampach chorych na AD (Sultana i wsp., 2006; Butterfield i wsp., 2006). Obniżony poziom *PIN1* i utlenienie *PIN1* może nie tylko wpływać na cykl komórkowy, ale także prowadzić do tworzenia się NFT oraz A $\beta$  (Sultana i Butterfield, 2010; Aluise i wsp., 2010). Natomiast nadekspresja *PIN1* w warunkach *in vitro* wpływa na obniżenie poziomu A $\beta$  oraz NFT (Pastorino i wsp., 2006). Podwyższony poziom *PIN1* u osób, u których klinicznie nie zaobserwowano AD, natomiast w badaniu autopsyjnym stwierdzono blaszki amyloidowe i NFT, tłumaczy się jako mechanizm kompensacyjny mózgu, chroniący przed rozwinięciem AD poprzez oddziaływanie *PIN1* z A $\beta$ PP i hiperfosforylowanym tau (Aluise i wsp., 2010). Zważywszy powyższe dane, dysfunkcja *PIN1* albo obniżenie jego poziomu może prowadzić do neurodegeneracji (por. Ryc. 6).

Poza opisanymi powyżej właściwościami, *PIN1*, występując w dużym stężeniu w zakończeniach postsynaptycznych, wydaje się przeciwdziałać procesom neurozwyrodnieniowym poprzez obniżenie syntezy potencjalnie toksycznych białek, które indukują apoptozę neuronów (Westmark i wsp., 2010). Ponadto, *PIN1* jest inhibitorem syntezy mózgowej izoformy kinazy białkowej M  $\zeta$  (*protein kinase M  $\zeta$* , PKM $\zeta$ ), odpowiedzialnej za indukcję i utrzymanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*long-term potentiation*, LTP), a co za tym idzie - śladów pamięciowych (Westmark i wsp., 2010). Natomiast przekaznictwo glutaminianowe związane z powstawaniem LTP, blokuje aktywność *PIN1*, umożliwiając tym samym syntezę PKM $\zeta$ , która inhibuje aktywność *PIN1* (Westmark i wsp., 2010). Wydaje się, że sprzężenie zwrotne pomiędzy *PIN1* a PKM $\zeta$  jest krytyczne dla trwania śladów pamięciowych, szczególnie tych długoterminowych (Westmark i wsp., 2010).



**Ryc. 6. Udział dysfunkcji PIN1 w chorobie Alzheimera.** PIN1 katalizuje konwersję ufosforylowanych reszt AβPP z konformacji *cis* do występującej powszechnie w warunkach fizjologicznych konformacji *trans*, co sprzyja nieamyloidogennemu przecinaniu AβPP. W wyniku dysfunkcji PIN1 dochodzi do zwiększenia ilości cząsteczek *cis*-AβPP, amyloidogennej przycinania AβPP i gromadzenia się blaszek amyloidowych. PIN1 zapobiega nadmiernemu ufosforylowaniu białka Tau, zmieniając konformację hiperfosforylowanego Tau, co ułatwia jego defosforylację i tym samym przywraca normalne, fizjologiczne funkcje – wiązania i polimeryzacji tubuliny oraz stabilizacji mikrotubul. Fosfataza PP2A defosforyluje tylko *trans*-pTau. *Cis*-pTau nie podlega defosforylacji, więc w rezultacie dochodzi do hiperfosforylacji cząsteczki Tau. Dochodzi do agregowania Tau i powstawanie zwyrodnienia neurowłókienkowego.

Przedstawione dane wskazują, że *PIN1* jest nie tylko funkcjonalnym, ale także pozycyjnym genem kandydującym dla AD. Obserwowany spadek poziomu *PIN1* w AD może wynikać z działania stresu oksydacyjnego, ale także ze zmian w sekwencji genu kodującego *PIN1* (Pastorino i wsp., 2006; Segat i wsp., 2007). Dotychczas powstało niewiele prac na temat zmienności *PIN1* u chorych z AD. Segat i wsp. (2007) postulowali udział allelu -842C i haplotypu -842C/-667C w zwiększaniu ryzyka zachorowania na AD, jednak inni badacze nie powtórzyli tego wyniku (Poli i wsp., 2005; Lambert i wsp., 2006; Nowotny i wsp., 2007). Nie przeprowadzono dotąd analizy haplotypów tworzonych przez polimorfizmy regionu promotorowego i kodującego *PIN1*. Nie zbadano także sekwencji *PIN1* w grupie chorych na EOAD. Postanowiono zatem sprawdzić, czy zmiany w sekwencji *PIN1* mogą być związane z ryzykiem EOAD, LOAD oraz czy mogą wpływać na aktywność transkrypcyjną *PIN1*.

### 1.2.5.5 HFE

Wiele badań wskazuje na rolę zaburzonej homeostazy metali, w tym żelaza, w patogenezie AD (Smith i wsp., 1997, 2010). Żelazo jest wchłaniane wraz z pokarmem i tylko minimalne jego ilości ulegają wydaleni, zatem wraz z wiekiem dochodzi do jego gromadzenia się w organizmie. Pomimo że żelazo jest niezbędnym kofaktorem wielu białek zaangażowanych w funkcje neuronów, jego

akumulacja jest szkodliwa i prowadzi do szeregu chorób. Zaburzoną homeostazę żelaza powiązano z występowaniem cukrzycy oraz chorób naczyniowych, które z kolei zwiększają ryzyko zachorowania na AD (Dwyer i wsp., 2009; Lee i wsp., 2007; Pulliam i wsp., 2003; Moalem i wsp., 2000).

Żelazo jest najpowszechniejszym metalem o właściwościach oksydoredukcyjnych u człowieka (Dwyer i wsp., 2009), dlatego ważną konsekwencją jego zaburzonej homeostazy w neuronach jest stres oksydacyjny, pojawiający się już na bardzo wczesnym etapie AD (Connor i Lee, 2006; Castellani i wsp., 2007; Smith i wsp., 2010). Z dotychczasowych badań wynika, że w przebiegu AD dochodzi do gromadzenia się żelaza przede wszystkim w hipokampie, korze mózgowej i jądrach podstawy (Smith i wsp., 2010; Zhu i wsp., 2007). Uważa się, że żelazo stymuluje odkładanie się A $\beta$  w postaci blaszek amyloidowych oraz powstawanie NFT (Rottkamp i wsp., 2001; Connor i wsp., 1992; Castellani i wsp., 2007).

Czynnikiem integrującym wpływ genów i środowiska na poziom żelaza jest produkt genu hemochromatozy (*hemochromatosis gene, HFE*), biorący udział w homeostazie żelaza. *HFE* jest zlokalizowany na chromosomie 6 (6p21.3), który w badaniach sprzężeń jest wiązany z AD (Butler i wsp., 2009). Jego produkt, białko HFE, wykazuje homologię z głównymi białkami układu zgodności tkankowej klasy I i jest bierze udział w odporności wrodzonej oraz regulacji absorpcji żelaza (Connor i Lee, 2006). HFE wiąże się w cytoplazmie z  $\beta$ 2-mikroglobuliną, a następnie w błonie komórkowej z receptorem dla transferryny, co zmniejsza powinowactwo transferryny do żelaza, a tym samym jego absorpcję.

Stwierdzono, że dwa polimorfizmy *HFE* (His63Asp oraz Cys282Tyr) wpływają na proces absorpcji żelaza, stąd wydaje się, że mogą przyczyniać się do gromadzenia się żelaza w mózgu chorych i/lub wcześniejszego wystąpienia objawów AD. Obie te zmiany są powiązane także z wyższym poziomem aluminium we krwi, które potęguje indukowaną żelazem peroksydację lipidów (Moalem i wsp., 2000).

Polimorfizm Cys282Tyr (G845A, rs1800562), występujący u ok. 85% chorych na dziedziczną hemochromatozę<sup>10</sup>, powoduje brak HFE na powierzchni komórki, czyli nie ogranicza wiązania się transferryny do jej receptora, doprowadzając do wzrostu poziomu żelaza w komórce (Connor i Lee, 2006; Mitchell i wsp., 2009; Johnstone i Milward, 2010). Polimorfizm His63Asp (C187G, rs1799945) jest także związany ze zniesieniem ograniczenia wchłaniania żelaza (Lee i wsp., 2007; Connor i Lee, 2006). Sugeruje się, że szczególnie oddziałuje na poziom żelaza w mózgu (Johnstone i Milward, 2010).

Podwyższony poziom żelaza może wpływać na komórkowy stres oksydacyjny oraz nasilać odpowiedź zapalną makrofagów. Komórki neuroblastomy z nadekspresją *HFE* z wariantem His63Asp, wykazują wyższą podatność na stres oksydacyjny w porównaniu z komórkami

---

<sup>10</sup> Dziedziczna hemochromatoza – choroba dziedziczona autosomalnie recesywnie, dotyczy metabolizmu żelaza, jedna z najpowszechniejszych chorób genetycznych. Zachodzi odkładanie się żelaza w wielu tkankach, co prowadzi do wieloorganowej dysfunkcji. Gen *HFE* jest tylko jednym z wielu genów zaangażowanych w powstawanie tej choroby.

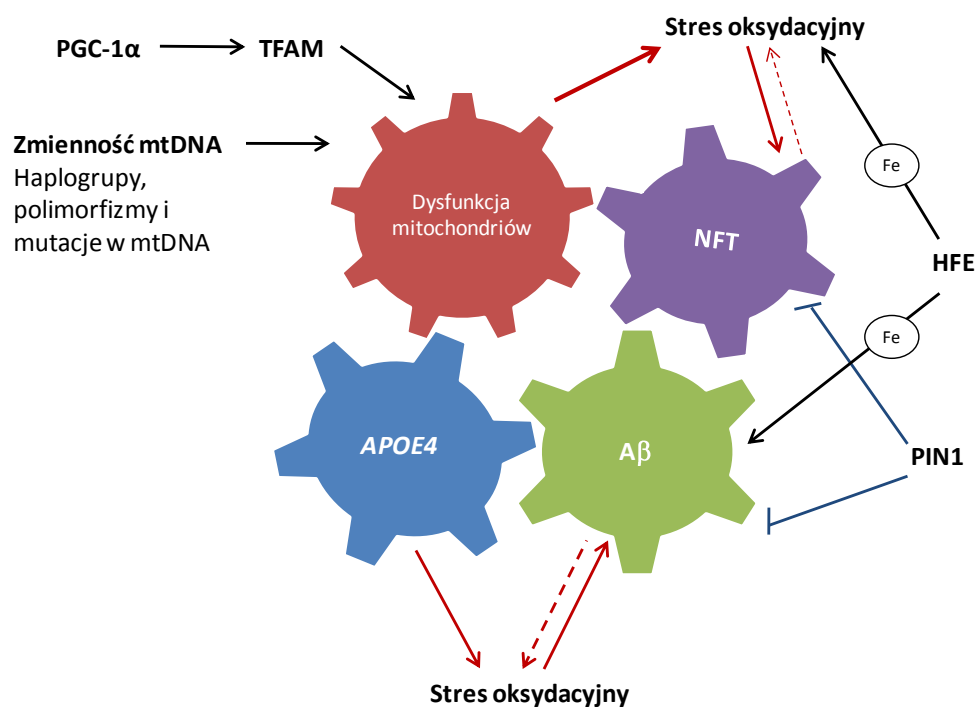
---

ekspresyjnymi *HFE* z Cys282Tyr (Lee i wsp., 2007). Ponadto, komórki neuroblastomy z His63Asp wykazują wzmożoną fosforylację tau (Hall i wsp., 2009). Wariant His63Asp jest powiązany z 30% wzrostem poziomu ufosforylowanych cząsteczek PIN1, co może oznaczać spadek aktywności PIN1 (Hall i wsp., 2010). PIN1 jest białkiem wrażliwym na stres oksydacyjny (Butterfield i wsp., 2006). U chorych na AD nosicieli dwóch alleli 63Asp stwierdzono podwyższony poziom markerów stresu oksydacyjnego w płynie mózgowo-rdzeniowym (Pulliam i wsp., 2003). Ponadto His63Asp jest wiązany ze zmianą homeostazy glutamianu (Mitchell i wsp., 2009). Stąd chroniczne wieloletnie akumulowanie się żelaza może stwarzać sprzyjające środowisko dla procesu neurodegeneracji.

Utrzymywanie się występowania zmutowanej wersji *HFE* (His63Asp, Cys282Tyr) w populacji ogólnej, poza chorymi na hemochromatozę, tłumaczone jest jego prawdopodobnym dobroczynnym działaniem w pewnych okresach życia, w określonych warunkach środowiskowych, jak np. na wsi, gdzie spożywana jest mała ilość żelaza w pokarmie. Obecność zmutowanych wariantów *HFE* może np. chronić przed anemią wywołaną malarią, czy kobiety w okresie menstruacji bądź ciąży (Blázquez i wsp., 2007; Moalem i wsp., 2000).

Polimorfizmy His63Asp oraz Cys282Tyr *HFE* stanowią wyznacznik poziomu żelaza u osób rasy kaukaskiej (Alizadeh i wsp., 2009) i z tego względu zostały zaproponowane jako potencjalny czynnik ryzyka AD. Dotychczasowe badania nad ich rolą w AD przyniosły niejednoznaczne wyniki. Część badań przemawia za ich rolą w przyspieszaniu pojawienia się objawów AD (His63Asp) (Sampietro i wsp., 2001), inne donoszą o epistatycznych oddziaływaniach pomiędzy zmianami w *HFE* i zmianami w innych genach (Correia i wsp., 2009; Combarros i wsp., 2003; Kauwe i wsp., 2010; Lehmann i wsp., 2010). Zwraca się też uwagę na różnice w rozmieszczeniu geograficznym nosicieli homozygot 282Tyr. Postuluje się wyższą ich częstość na północy Europy (Lehmann i wsp., 2010).

Podsumowując, etiopatogeneza choroby Alzheimera zależy najprawdopodobniej od wpływu zmienności mtDNA, genów jądrowych i/lub ich wzajemnych interakcji. Przedstawione we Wstępie dane dotyczące mtDNA oraz wybranych genów jądrowych przekonują o zasadności ich wyboru do analizy. Na Ryc. 7 przedstawiono schematycznie wybrane do badania czynniki genetyczne, związane z ryzykiem AD.



**Ryc. 7.** Schemat podsumowujący badane czynniki genetyczne w chorobie Alzheimera – zmienność mtDNA, *PGC-1α* (Gly482Ser), *TFAM* (rs1937, rs2306604), *HFE* (His63Asp oraz Cys282Tyr), *APOE4*, zmienność genu *PIN1*. W chorobie Alzheimera dochodzi m.in. do dysfunkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego, powstawania  $A\beta$  oraz hiperfosforylacji białka tau i jego akumulacji w postaci zwyrodnienia neurofibrilarnego. Dodatkowo, na zachorowanie wpływa uznany czynnik ryzyka, nosicielstwo allelu *APOE4*. Analizowane w rozprawie zmiany genetyczne w mtDNA, *PGC-1α*, *TFAM*, *HFE*, *PIN1* mogą modyfikować stopień ryzyka zachorowania na AD, wpływając na oznaczone na schemacie procesy.





## 2 CELE PRACY

Podstawowym celem niniejszej pracy jest próba określenia podłoża genetycznego choroby Alzheimera poprzez analizę zmienności mitochondrialnego DNA oraz wybranych genów jądrowych. Do szczegółowych celów projektu należą:

1. Zbadanie wpływu zmienności mtDNA na ryzyko AD.
  - 1A. Określenie rodzajów i częstości występowania haplotypów, haplogrup, podhaplogrup i podtypów mtDNA w grupach chorych z AD (EOAD, LOAD, stulatkowie z AD) w porównaniu z grupą kontrolną, oraz z grupą osób z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych.
  - 1B. Analiza zmienności regionu kontrolnego mtDNA w grupach chorych z AD (EOAD, LOAD, stulatkowie z AD) w porównaniu z grupą kontrolną.
  - 1C. Określenie częstości mitochondrialnych haplogrup wiązanych ze sprzężaniem/rozprzężaniem fosforylacji oksydacyjnej w grupie chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.
2. Analiza zmienności wybranych genów jądrowych mogących wpływać na ryzyko AD.
  - 2A. Określenie częstości występowania wybranych polimorfizmów genów *APOE*, *PGC-1 $\alpha$* , *TFAM*, *HFE* w grupach chorych z AD (EOAD, LOAD) w porównaniu z grupą kontrolną.
  - 2B. Analiza zmienności genu *PINI* w grupach chorych z AD (EOAD, LOAD) w porównaniu z grupą kontrolną.
3. Określenie oddziaływań epistatycznych pomiędzy analizowanymi polimorfizmami genów jądrowych i polimorfizmami mtDNA.
4. Próba określenia, czy otępienie w przedziałach wiekowych <65 lat, >65lat oraz 95-100 lat ma podobne podłoże genetyczne.



### 3 BADANI, MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Omówienie badanych grup

Badania przeprowadzono w grupie osób z rozpoznaną prawdopodobną chorobą Alzheimera, w grupie osób z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych oraz w grupie kontrolnej. Charakterystyka grup badanych została przedstawiona w Tab. 3. Chorych kwalifikowano do badań w Poradni Alzheimerowskiej ZKBChZ CUN, IMDiK PAN/MSWiA w Warszawie na podstawie diagnozy neurologa, neuropsychologa i psychiatry, wyników badań biochemicznych oraz obrazu tomografii mózgu. Diagnoza AD była stawiana zgodnie z kryteriami National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (McKhan i wsp., 1984). Wiek wystąpienia pierwszych objawów zaburzeń poznawczych, w tym zaburzeń pamięci, uznano za umowny wiek zachorowania na AD. W przypadku grupy kontrolnej termin „wiek” oznacza wiek w momencie pobrania krwi.

Kryterium rozróżniającym LOAD i EOAD był wiek pojawienia się pierwszych objawów choroby – dla LOAD >65 natomiast dla EOAD <65 lat. Spośród 49 osób z EOAD, 26 charakteryzuje rodzinna historia zachorowania na AD. W grupie EOAD poszukiwano uprzednio mutacji w genach *PSEN1*, *PSEN2* i *APP*.

**Tabela 3. Charakterystyka badanych grup.**

Badana grupa	LOAD	EOAD	Grupa kontrolna
Liczba osób	422	49	318
Kobiety/Mężczyźni	272/150	28/21	230/88
wiek zachorowania/badania $\pm$ SD* (lata)	74,6 $\pm$ 5,58	52,6 $\pm$ 9,8	70,4 $\pm$ 5,88

\*średni wiek badanych $\pm$ SD (odchylenie standardowe)

Dodatkową grupę porównawczą stanowiły osoby z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych (n=105). W grupie MCI dwadzieścia trzy osoby po upływie kilku lat od rozpoczęcia ich obserwacji, rozwinęły AD (n=23), jednej osobie postawiono rozpoznanie otępienia czołowo-skroniowego, a u czterech zdiagnozowano otępienie naczyniopochodne. Osoby z MCI, które rozwinęły pełnoobjawową postać AD zostały włączone do grupy chorych z LOAD.

Grupa kontrolna składa się z osób klinicznie zdrowych, zakwalifikowanych do udziału w badaniach przez neurologa. Specyficzną grupę porównawczą w badaniach stanowiło 174 stulatków (28 mężczyzn, 146 kobiet), których DNA zgromadzono w ramach zakończonego projektu “Genetyczne i środowiskowe czynniki długowieczności polskich stulatków” PBZ-KBN-022/P05/1999. W grupie tej znajdują się osoby o wysokim poziomie MMSE (>28), jak również osoby o poważnym zaawansowaniu procesów otępiennych, w tym z rozpoznaniem klinicznym AD.

Chorzy z AD (bądź ich prawni opiekunowie), osoby z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych, osoby należące do grupy stulatków oraz osoby z grupy kontrolnej wyrazili zgodę na udział w badaniach. Komisja Etyki i Nadzoru nad Badaniami na Ludziach i Zwierzętach Centralnego

---

Szpitala Klinicznego MSWiA wyraziła zgodę (nr 71/2006) na przeprowadzenie opisanych badań, stanowiących częściowo realizację grantu N N401 062235, "Badanie zmienności mitochondrialnego DNA w późnoobjawowej chorobie Alzheimera".

### **3.2 Analiza zmienności genu *PINI***

Badanie zmienności sekwencji *PINI* przeprowadzono w grupie 111 chorych z LOAD losowo wybranych z grupy 422, o średnim wieku zachorowania 73,2±5,0 lat (69,4% kobiet) oraz 49 chorych na EOAD. Grupa kontrolna była złożona z 104 zdrowych pod względem neurologicznym osób, losowo wybranych z grupy 318 osób, opisanych powyżej. Średnia wieku w 104-osobowej grupie kontrolnej wynosiła 75,1±5,2 lata.

### **3.3 Zastosowane techniki**

#### **3.3.1 Izolacja DNA i RNA z krwi obwodowej**

Około 10 ml krwi obwodowej mieszano z 0,5 ml 0,5M EDTA (pH=8) a następnie prowadzono izolację DNA metodą stopniowego wysalania białek komórkowych (Miller i wsp., 1988). Wyizolowany DNA zawieszano w wodzie i przechowywano w -20°C.

Preparaty wyizolowanych leukocytów, poddawane dalszej procedurze izolacji RNA były zawieszone w odczynniku RNALater® (Ambion) i przechowywane najpierw w 4°C, a następnie w -20°C.

#### **3.3.2 Pomiar spektrofotometryczny DNA oraz RNA**

Jakość oraz ilość preparatów DNA oraz RNA sprawdzano spektrofotometrycznie (Eppendorf BioPhotometer lub Nanodrop ND-1000). Dodatkowo, jakość preparatów RNA sprawdzano techniką elektroforetyczną. Preparaty DNA dla celów standardowej analizy (PCR, sekwencjonowanie) rozcieńczano do stężenia 200 ng/μl, natomiast do genotypowania techniką analizy dyskryminacji alleli z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym rozcieńczano je do stężenia 5-20 ng/μl.

#### **3.3.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy, PCR**

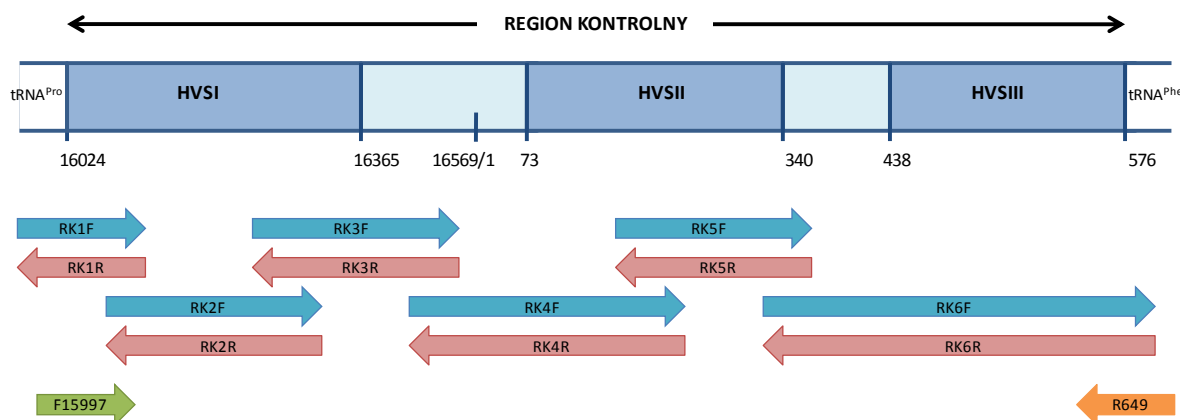
Reakcję PCR (*polymerase chain reaction*) prowadzono w termocyklerach Eppendorf Mastercycler Gradient, Biometria UNO II oraz DNA Engine Bio-rad. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły odczynniki Taq PCR Core Kit (Qiagen), ultraczystej wody i pary starterów. W zależności od rodzaju starterów wprowadzane były modyfikacje do podstawowego składu mieszaniny. Najczęściej stosowano protokół opisany w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji techniką PCR.

Mieszanina reakcyjna:	Końcowe stężenie składników w mieszaninie
10X PCR Buffer	1X
dNTP mix (10mM każdego dNTP)	0,8 mM
Starter F (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M
Starter R (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M
Polimeraza Taq DNA	0,5 U
DNA	Zmienna objętość – ok.1 $\mu$ l (ok. 100 ng)
H <sub>2</sub> O	Zmienna objętość

### 3.3.3.1 Amplifikacja regionu kontrolnego mtDNA

Analizie poddano całą sekwencję regionu kontrolnego (1122 pz) mtDNA. Do jego amplifikacji wykorzystano startery F15997 i R649 (Piercy i wsp., 1993; Levin i wsp., 2003). Miejsca ich wiązania się do sekwencji mtDNA przedstawiono na Ryc. 8.



**Ryc. 8.** Schemat rozmieszczenia starterów (RK1-RK6) i tworzonych przez nie amplikonów, służących do amplifikacji preparatów DNA, które nie poddały się standardowej amplifikacji z udziałem starterów F15997 i R649, także pokazanych na rycinie. Na rycinie zaznaczono fragmenty hiperzmiennne – HVSI, HVSII, HVSIII.

Skład mieszaniny reakcyjnej, przedstawiony w Tab. 4, wzbogacono o MgCl<sub>2</sub> o końcowym stężeniu 1,5 mM. Reakcję prowadzono w objętości 15  $\mu$ l w warunkach podanych w Tab. S1 (Suplement). Powstały produkt, po oczyszczeniu, sekwencjonowano z zastosowaniem starterów wewnętrznych oraz F15997 i R649. Dla preparatów DNA, których amplifikacja RK przy pomocy pary starterów L15997 i R649 nie powiodła się (z uwagi np. na częściową degradację preparatów DNA), zastosowano alternatywny zestaw starterów (por. Tab. S2, Suplement). Dzięki alternatywnemu zestawowi starterów powielano RK w sześciu nakładających się fragmentach (por. Ryc. 8), w warunkach przedstawionych w Tab. S1. Ten zestaw starterów wykorzystano do amplifikacji dwóch preparatów DNA od chorych z LOAD i pięciu od chorych z EOAD. Z każdej pary starterów RK1-RK6 jeden z nich był wykorzystany w reakcji sekwencjonowania.

---

### **3.3.3.2 Amplifikacja fragmentów sekwencji kodującej mtDNA w celu zaklasyfikowania nosicieli haplogrupy H do podhaplogrup i podtypów.**

W przypadku haplogrupy H, której większość podhaplogrup i podtypów nie posiada definiujących je polimorfizmów w obrębie RK, konieczne było przeanalizowanie dodatkowych polimorfizmów znajdujących się w sekwencji kodującej mtDNA (ich zestawienie przedstawiono w Tab. S3, Suplement). Dla rzadziej występujących podhaplogrup i haplotypów, bądź definiowanych przez polimorfizmy zlokalizowane w miejscach, do których nie było możliwe dobranie enzymu restrykcyjnego ani sondy TaqMan, zdecydowano się na przeprowadzenie analizy przez sekwencjonowanie. Pierwszym etapem analizy była amplifikacja PCR z zastosowaniem starterów opisanych w Tab. S3. Warunki reakcji odbiegające od opisanych w Tab. 4, zaznaczono w Tab. S3. Produkt PCR, po oczyszczeniu, stanowił matrycę dla reakcji sekwencjonowania z zastosowaniem jednego startera z każdej pary.

### **3.3.3.3 Amplifikacja fragmentu genu APOE**

Sekwencje starterów oraz warunki amplifikacji fragmentu genu *APOE* zaczerpnięto z artykułu Hendersona i wsp. (2002). Mieszaninę reakcyjną opisaną w Tab. 4 uzupełniono 5X Q-Solution (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. Warunki prowadzonej reakcji amplifikacji obejmowały: wstępny etap denaturacji (94 °C, 4 min), 35 cykli (denaturacja 94 °C, 10 s; przyłączanie starterów 68°C, 20 s; wydłużanie 72 °C, 30 s), końcowa synteza 7 min, 72 °C. Powstały produkt był poddawany analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych.

### **3.3.3.4 Amplifikacja sekwencji genu PIN1**

Analizowano region promotorowy (1545 pz, NCBI GenBank AF501321) oraz region kodujący *PIN1* – 4 eksony wraz z flankującymi sekwencjami intronowymi o długości ok. 100 pz (NCBI GenBank NM\_006221, NC\_000019.8). W przypadku stosowania starterów ex3F i ex3R; ex4aF i ex4aR; ex4bF i ex4bR skład mieszaniny reakcyjnej odpowiadał podanemu w Tab. 4. Dla pozostałych par starterów w Tab. S4 (Suplement) podano stosowane dodatkowe składniki. Warunki reakcji amplifikacji obejmowały: wstępny etap denaturacji (94 °C, 2,5 min), 35 cykli (denaturacja 94 °C, 30 s; przyłączanie starterów – temperatura podana w Tab. S4, 45 s; wydłużanie 72 °C, 1 min), końcowa synteza 7 min, 72°C.

## **3.3.4 Rozdział elektroforetyczny**

Wielkość fragmentów DNA oceniano techniką elektroforetyczną w 2% żelu agarozowym, w buforze 1X TBE (*Tris-Borate-EDTA*) wg Sambrook i Russell (2001). Następnie były one wizualizowane w przechodzącym świetle ultrafioletowym, dzięki interkalacji bromku etydyny (3ul/200ml żelu agarozowego, 10mg/ml) w dwuniciową cząsteczkę DNA.

### 3.3.5 Oczyszczanie produktu PCR

Produkt PCR oczyszczano od niewłączonych nukleotydów oraz starterów z zastosowaniem ExoSAP (USB), zgodnie z zaleceniami producenta

### 3.3.6 Bezpośrednie sekwencjonowanie fluorescencyjne

Reakcję sekwencjonowania prowadzono techniką opartą na zmodyfikowanej metodzie Sangera, z zastosowaniem terminacji syntezy kwasów nukleinowych poprzez przyłączanie dideoksynukleozydotrifosforanów (ddNTP) wyznakowanych czterema różnymi fluorochromami. Zastosowano zestaw ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (Applied Biosystems). Matrycę do reakcji stanowił oczyszczony produkt PCR, rozcieńczony ok. 20x dejonizowaną H<sub>2</sub>O. Reakcję sekwencjonowania prowadzono w końcowej objętości 10 µl, w warunkach zgodnych z zaleceniami producenta.

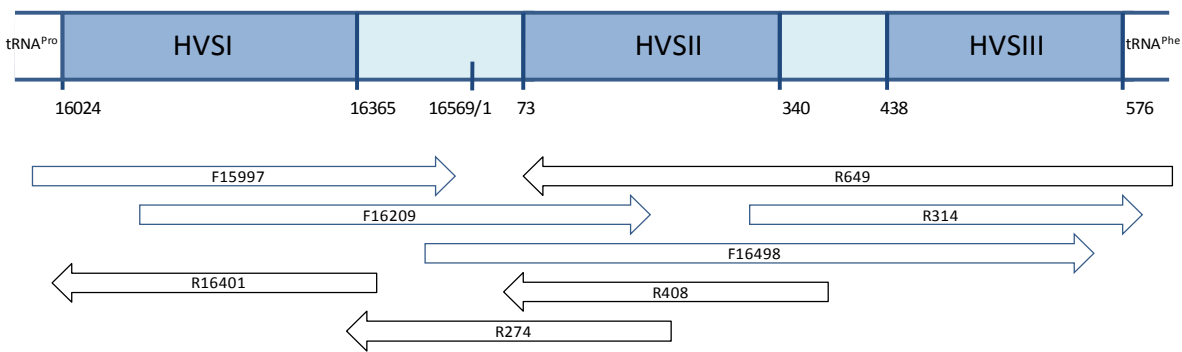
Produkt reakcji sekwencjonowania oczyszczano za pomocą precypitacji etanolem (EtOH 95%) w obecności octanu sodu (NaOAc, 3M, pH 4,6). Do zliofilizowanego produktu oczyszczania dodawano ok. 15µl formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems) i poddawano denaturacji przez 3 min w 95°C. Następnie schładzano preparat na lodzie (ok. 1 min).

Produkty reakcji PCR sekwencyjnego rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej w analizatorze kwasów nukleinowych ABI Prism® Genetic Analyzer 310 lub 3130 (Applied Biosystems). Analiza wyników sekwencjonowania była prowadzona z zastosowaniem programu SeqMan (DNASTAR, Lasergene). Zidentyfikowane zmiany porównywano z dostępnymi bazami danych i danymi literaturowymi. W przypadku stwierdzenia mutacji, analizie powtarzano od etapu amplifikacji PCR.

#### 3.3.6.1 Sekwencjonowanie oraz analiza regionu kontrolnego mtDNA

Do reakcji sekwencjonowania RK stosowano zestaw 8 starterów (Helgason i wsp. 2000; Levin i wsp. 2003; Piercy i wsp. 1993). Ich rozmieszczenie przedstawiono na Ryc. 9.

Dla każdego badanego DNA wykonano przynajmniej trzy reakcje sekwencjonowania. W przypadku preparatów DNA pozbawionych heteroplazmii długości do poznania całej sekwencji RK wystarczyły startery F15997, F16498 oraz R649. W preparatach DNA zawierających heteroplazmię długości w regionie 16184-16193, poza starterami F15997, F16498 oraz R649, wykorzystywano także startery F16209 oraz R16401, pozwalające ocenić długość traktu poliC w regionie 16184-16193 i przeanalizować sekwencję za miejscem heteroplazmii. W preparatach DNA z heteroplazmią długości w regionie 303-315 poza starterami F15997, F16498 oraz R649 wykorzystywano startery F314, H408. W preparatach DNA z heteroplazmią długości w regionie 523-524 oraz 568-573 poza starterami F15997, F16498, R649 wykorzystywano starter F314. Starter R274 był używany do rozstrzygnięcia niejasności w sekwencjach amplifikowanych z udziałem startera F15997 lub F16209.



**Ryc. 9. Zakres amplifikowanych fragmentów regionu kontrolnego mtDNA. Literą F (od ang. *forward*) oznaczono startery wiążące się do nici lekkiej, natomiast literą R (od ang. *reverse*) oznaczono startery wiążące się do nici ciężkiej mtDNA. Zaznaczono fragmenty hiperzmiennie – HVS I, HVS II, HVS III.**

W przypadku analizy sekwencji RK mtDNA badane sekwencje porównywano z sekwencją rCRS. Zidentyfikowane zmiany weryfikowano w bazie danych o ludzkim mtDNA, MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>) oraz w bazie zmian polimorficznych mtDNA, PhyloTree (<http://www.phylotree.org/>). Nowym wariantem określano zmianę w sekwencji mtDNA w stosunku do rCRS, nieopisaną dotąd w żadnej z powyższych baz danych. Sprawdzone jej występowanie także w prywatnych bazach sekwencji mtDNA zamieszczonych w Internecie.

Zmianę heteroplazmatyczną (współobecność allelu dzikiego i zmutowanego) definiowano jako obecność dodatkowego allelu, w ilości co najmniej 15% allelu zasadniczego. Zmiany heteroplazmatyczne potwierdzano stosując reakcją sekwencjonowania z wykorzystaniem drugiego startera z pary. Nazewnictwo podstawień w sekwencji mtDNA zostało oparte na metodologii opisanej przez Wilson i wsp. (2002).

### 3.3.7 Zastosowanie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych do identyfikacji podhaplogrup H1 i H3

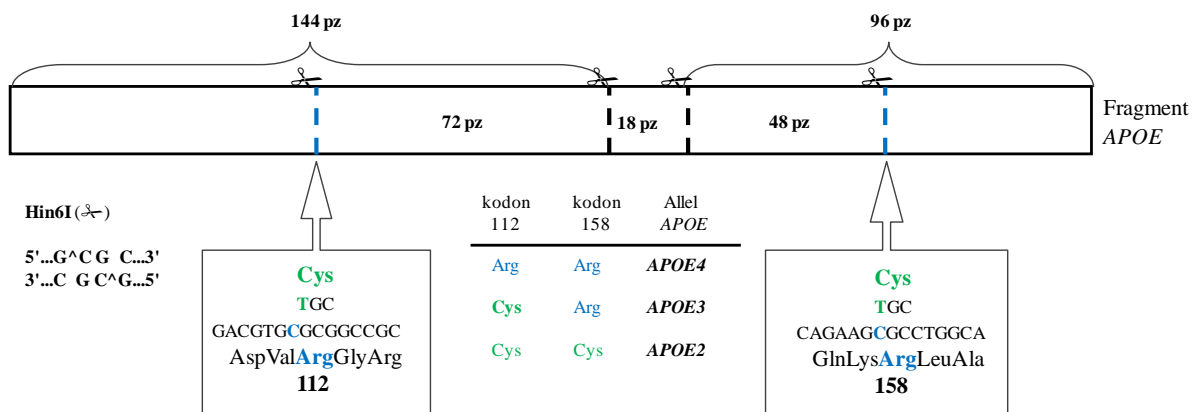
Produkt amplifikacji fragmentu sekwencji mtDNA zawierający polimorfizm m.3010A>G, definiujący podhaplogrupę H1, trawiono enzymem Hpy188III (New England Biolabs), natomiast produkt amplifikacji fragmentu sekwencji mtDNA z polimorfizmem m.6776T>C, charakterystycznym dla podhaplogrupy H3, trawiono enzymem NlaIII (New England Biolabs). Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki trawienia były zgodne z zaleceniami producenta. W obecności m.3010G enzym Hpy188III przecina amplikon na cztery fragmenty, natomiast w obecności m.3010A - na trzy fragmenty. Miejsce cięcia enzymem NlaIII powstało dzięki zastosowaniu startera wprowadzającego miejsce restrykcyjne poprzez tzw. *mismatch (amplification-created restriction site, ACRS)* w pozycji m.6773.

### 3.3.8 Zastosowanie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych do określenia genotypu APOE

W zależności od rodzaju allelu APOE (APOE2, APOE3 i APOE4) enzym Hin6I (Fermentas)



przecina powielony fragment *APOE* na różną liczbę odcinków (por. Ryc. 10).



Ryc. 10. Schemat miejsc trawienia enzymu Hin6I w zamplifikowanym fragmencie genu *APOE*.

Warunki trawienia enzymem Hin6I zaczerpnięto z metody opisanej przez Henderson i wsp. (2002). Skład mieszaniny reakcyjnej był zgodny z zaleceniami producenta. Inkubacja była prowadzona w 37°C przez ok. 16 godzin. Rezultatem genotypowania był podział grup badanych ze względu na nosicielstwo allelu *APOE4*. Wyróżniono nosicieli przynajmniej jednego allelu *APOE4* (status *APOE4+*) oraz osoby nie posiadające allelu *APOE4* (status *APOE4-*).

### 3.3.9 Wysokosprawna chromatografia cieczowa w warunkach denaturujących

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w warunkach denaturujących (*denaturing high-performance liquid chromatography*, DHPLC) została wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. DHPLC jest techniką przesiewową, pozwalającą na detekcję zmian sekwencji badanego DNA. Technikę DHPLC zastosowano do określenia występowania zidentyfikowanych mutacji w *PINI* u chorych na EOAD, LOAD oraz w grupie kontrolnej oraz do określenia częstości występowania polimorfizmów *PINI*, obecnych w postaci heterozygotycznej (rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2233682, rs2233683, rs2010457) w grupie kontrolnej. Analizę DHPLC prowadzono w systemie chromatograficznym Hewlett-Packard 1050/1100 w warunkach podanych w Tab. S5 (Suplement). Produkty amplifikacji PCR denaturowano w temperaturze 95°C przez 5 min, następnie pojedyncze nici renaturowano obniżając stopniowo temperaturę z 95 do 45°C przez ok. 50 minut, co pozwala na uzyskanie homo- i heterodupleksów. Tak przygotowany produkt PCR (5–10 µl) nastrzykiwano na kolumnę HELIX DNA 50×3,0 mm (CP28353; Varian). Rozdział wykonano na kolumnie chromatograficznej, w warunkach częściowej denaturacji (0,1M TEAA, pH 7,0, gradient wzrastającego stężenia acetonitrylu), w optymalnej, dobranej empirycznie temperaturze rozdziału. Wstępne warunki rozdziału ustalono stosując program DNA MELT (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). Fragmenty o odmiennym od pozostałych profilu elucji poddawano następnie reakcji sekwencjonowania bezpośredniego.

---

### 3.3.10 Genotypowanie z zastosowaniem analizy dyskryminacji alleli z wykorzystaniem sond TaqMan i *real-time* PCR

Analizę dyskryminacji alleli z zastosowaniem sond TaqMan zastosowano do genotypowania 9 polimorfizmów (m.7028C>T, m.10398A>G, m.13708G>A, m.1719G>A, m.4580G>A, m.8251G>A, m.12308A>G, m.9055G>A, m.13368G>A) w regionie kodującym mtDNA, co pozwoliło określić najczęstsze haplogrupy charakterystycznych dla populacji kaukaskiej, według klasyfikacji zaproponowanej przez Torroni i wsp. (1996). Zestaw sond i starterów do genotypowania wspomnianych polimorfizmów oraz ich charakterystykę zawarto w Tab. S6 (Suplement). Ponadto, genotypowano 5 polimorfizmów w genach jądrowych - rs8192678 (*PGC-1a*), rs1937 (*TFAM*), rs2306604 (*TFAM*), rs1800562 (*HFE*), rs1799945 (*HFE*) (Tab. S8, Suplement). Barwnikami reporterowymi w stosowanych sondach były: VIC<sup>11</sup>, 6-FAM (6-karboksylofluoresceina), i TET (tetrachloro-6-karboksylofluoresceina). Na końcu 3' sondy znajdował się barwnik tłumiący (tzw. *Quencher*) TAMRA (6-karboksylo-tetrametylo-rodamina) bądź NFQ (*Non-Fluorescent Quencher*) wraz z białkiem MGB (*Minor Groove Binder*). Empirycznie dobrano warunki reakcji oraz stężenia sond i starterów. Reakcję prowadzono w objętości 10 µl, w płytkach 96-dołkowych. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli dla 9 polimorfizmów mtDNA został opisany w Tab. S8 (Suplement), natomiast do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli dla polimorfizmów rs8192678, rs1937, rs2306604, rs1800562 oraz rs1799945 przedstawiono w Tab. S9 (Suplement). Reakcja była prowadzona w aparacie ABI 7500 lub StepOnePlus (Applied Biosystems). Warunki reakcji analizy dyskryminacji alleli obejmowały: 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. Otrzymane dane analizowano za pomocą oprogramowania SDS 2.0 i StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems).

### 3.3.11 Analiza ekspresji mRNA genu *PINI* w leukocytach krwi obwodowej

W celu sprawdzenia, czy występują różnice w ekspresji *PINI* u chorej niosącej wariant c.58+64C>T w porównaniu z czterema zdrowymi osobami przeprowadzono PCR z względną oceną ilości produktu w czasie rzeczywistym. Pierwszym etapem była izolacja RNA z limfocytów krwi obwodowej chorej oraz osób z grupy kontrolnej, a następnie wykonano odwrotną transkrypcję RNA na cDNA.

#### 3.3.11.1 Izolacja RNA

RNA izolowano z limfocytów krwi obwodowej z zastosowaniem protokołu TRI Reagent<sup>®</sup> Solution (Ambion), według zaleceń producenta. Powstały pelet RNA suszono przez ok. 5 minut i zawieszano go w 30-100 µl wody traktowanej DEPC (*Diethylpyrocarbonate*; DEPC H<sub>2</sub>O). Następnie oznaczono stężenie RNA na spektrofotometrze oraz sprawdzono elektroforetycznie jego jakość na żelu agarozowym.

---

<sup>11</sup> VIC to nazwa zastrzeżona przez firmę Applied Biosystems

### 3.3.11.2 Synteza cDNA

Stosowano dwuetapową metodę odwrotnej transkrypcji, w której etap przepisania RNA na cDNA oraz amplifikacja badanych sekwencji są rozdzielone. cDNA syntetyzowano z 1 µg całkowitego RNA, z wykorzystaniem protokołu SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Do syntezy cDNA zastosowano startery oligo(dT) i jednakową ilość RNA dla wszystkich badanych próbek. Przebieg syntezy był kontrolowany poprzez zastosowanie kontroli negatywnej, bez SuperScript™ III RT.

2 µl powstałego produktu wykorzystano do amplifikacji PCR z zastosowaniem starterów stosowanych dalej w technice PCR w czasie rzeczywistym. Pozwalało to zweryfikować wielkość powstałego produktu i temperaturę przyłączania się starterów.

### 3.3.11.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym

Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (nazywana też PCR w czasie rzeczywistym, od angielskiej nazwy *real-time PCR*, bądź ilościowym PCR, *quantitative PCR*, qPCR) jest metodą pozwalającą monitorować ilość produktu reakcji w każdym cyklu. Jednym z jej zastosowań jest względna ocena ekspresji genów, której wynikiem jest stosunek ilości transkryptu genu badanego do genu referencyjnego, którego poziom w warunkach doświadczenia jest stały.

#### 3.3.11.3.1 Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA ze względną oceną ilości produktu w czasie rzeczywistym

PCR w czasie rzeczywistym wykonywano w aparacie ABI 7500 (Applied Biosystems). Do analizy wykorzystano fluorochrom SYBR Green (Applied Biosystems).

Para starterów do amplifikacji fragmentu *PINI* została zaprojektowana do regionu, który jest obecny w każdym wariacie splicingowym *PINI*. Poziom ekspresji genu *PINI* normalizowano względem genu referencyjnego, podjednostki A dehydrogenazy bursztynianowej (*succinate dehydrogenase complex subunit A*, *SDHA*). Optymalne stężenie starterów (Tab. S10, Supplement) i cDNA wyznaczono doświadczalnie. Reakcję prowadzono w płytkach 96-dółkowych, w objętości 25 µl, w trzech powtórzeniach. Do każdego dołka dodawano 20 ng cDNA. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tab. S11 (Supplement). Warunki PCR w czasie rzeczywistym obejmowały: 10 min w 95°C, 40 cykli (95°C przez 15 s i 60°C przez 1 min). Po zakończeniu właściwej reakcji amplifikacji przeprowadzano analizę krzywej topnienia produktów PCR.

Wyniki analizowano z zastosowaniem metody porównawczej  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak i wsp., 2001) do obliczenia względnej różnicy poziomu ekspresji badanego genu między osobą niosącą mutację a grupą kontrolną. Najpierw wyznaczono cykle progowe (Ct) dla genów badanych i referencyjnych u chorej nosicielki wariantu c.58+64C>T oraz w grupie kontrolnej. Następnie obliczono różnicę pomiędzy wartością Ct

---

dla genu badanego (*PINI*) i Ct genu referencyjnego (*SDHA*) dla nosicielki wariantu c.58+64C>T oraz osób z grupy kontrolnej ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gen badany (PINI)}} - Ct_{\text{gen referencyjny (SDHA)}}$ ). Kolejno, wyznaczono różnicę  $\Delta Ct$  dla nosicielki wariantu c.58+64C>T względem osób z grupy kontrolnej ( $\Delta \Delta Ct$ ). Wartość względnego poziomu ekspresji genu *PINI* względem *SDHA* wyliczono według wzoru  $R = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

### 3.3.12 Analiza bioinformatyczna

Analiza *in silico* wspomaga konwencjonalne metody biologii molekularnej w projektowaniu badań oraz interpretacji wyników. Sekwencje badanych genów oraz mtDNA, a także podstawowe o nich informacje, poza danymi literaturowymi pobrano z ogólnie dostępnych baz danych: *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>).

Do odnajdywania wariantów polimorficznych w jądrowym DNA poza danymi literaturowymi służyły strony *dbSNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), *CHIP Bioinformatics Tools* (<http://snpper.chip.org>).

Poza danymi literaturowymi, obecność i różnorodność wariantów splicingowych sprawdzano na stronach *GeneCards* (<http://www.genecards.org/index.shtml>), *EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/astd/main.html>).

W celu wstępnego sprawdzenia ekspresji wybranych genów we krwi, mózgu i pozostałych tkankach człowieka korzystano z *Aceview* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Asembly/index.html>), *BioGPS* (<http://biogps.gnf.org/#goto=welcome>), *UniGene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>).

Zaprojektowane startery przy pomocy programu *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sprawdzano dzięki PCR *in silico*, wykorzystując narzędzie dostępne na stronie *UCSC In-Silico PCR* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>), a także stosując *Primer-Blast* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=NcbiHomeAd](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=NcbiHomeAd)).

Analiza wyników sekwencjonowania była wykonywana z zastosowaniem programu *SeqMan* (DNASTAR, Lasergene).

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

Do analizy zmian stwierdzonych w regionie promotorowym zastosowano programy *MatInspector* (Geneomatix software, Niemcy) oraz *Mapper* (<http://bio.chip.org/mapper>), które identyfikują sekwencje DNA, stanowiące potencjalne miejsce wiązania się znanych czynników transkrypcyjnych.

Do analizy wpływu mutacji na składanie pre-mRNA (splicing) zastosowano *ESEfinder release 3.0* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>), *Automated Splice Site Analyses* (Nalla i Rogan, 2005) oraz *RegRNA: A Regulatory RNA Motifs and Elements Finder* (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/about.html>). *ESEfinder* identyfikuje potencjalne miejsca wiązania

się czynników wzmacniających splicing należących do rodziny białek wiążących RNA bogatych w serynę i argininę (*serine/arginine-rich (SR) proteins*, białka SR). *Automated Splice Site Analyses* oszacowuje zmiany w sile miejsc splicingowych na podstawie modeli teoretycznych. Analizę sekwencji intronowych zawierających mutacje prowadzono także stosując program *RegRNA* (<http://regna.mbc.nctu.edu.tw/index.php>).

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

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

Do porównania ze sobą wielu sekwencji używano programów *Boxshade v.3.31* (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=boxshade>) oraz *Clustal X* (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>).

Do analizy nierównowagi sprzężeń wykorzystano dane The International HapMap Consortium ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

### 3.3.12.2 Zastosowane programy do analizy *in silico* sekwencji mitochondrialnego DNA

Do oznaczania haplotypów, haplogrup, podhaplogrup i ich podtypów korzystano z baz danych zgromadzonych na stronach Phylotree (<http://www.phylotree.org/>), Mitomanager (<http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>) oraz MITOMAP (<http://mitomap.org/MITOMAP>).

### 3.3.13 Najważniejsze z zastosowanych odczynników

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (Applied Biosystems)

Agaroza (Sigma-Aldrich)

Chloroform (Sigma-Aldrich)

EDTA (pH 8,0) (Sigma-Aldrich)

EtOH 70%, 95%

ExoSAP (USB)

Genetic Analyzer 10X Running Buffer with EDTA (Applied Biosystems)

Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)

Hin6I (Fermentas)

Hpy188III (New England Biolabs)

Kwas borny (Sigma-Aldrich)

NlaIII (New England Biolabs)

PCR Marker, 50-2000 bp (Sigma-Aldrich)

Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems)

RNAlater® (Ambion)

SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

Taq PCR Core Kit (Qiagen),

---

TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)

TRI Reagent® (Ambion)

Trizma® base (Sigma-Aldrich)

### 3.3.14 Analiza statystyczna

Do analizy częstości występowania alleli i genotypów stosowano test  $\chi^2$ , dwustronny dokładny test Fishera, analizę regresji logistycznej (PASW Statistics18, Graphpad Prism 5.0). Przeprowadzono oddzielne analizy dla całej grupy badanej, po stratyfikacji ze względu na płeć, nosicielstwo allelu *APOE4* oraz względem mediany dla wieku w poszczególnych grupach. W celu zbadania istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami wieku pojawienia się pierwszych objawów AD zastosowano test Manna-Whitneya. Istotność statystyczną przyjęto na poziomie  $p < 0,05$ .

Do sprawdzenia zależności między badanymi zmiennymi zastosowano m.in. analizę synergii w oparciu o metodę Cortina-Bojra i wsp. (2009), sprawdzającą wielkość, kierunek i istotność interakcji. Relacje synergistyczne pomiędzy czynnikami wyraża współczynnik synergii (*synergy factor*, SF) o wartości  $>1$ , natomiast antagonistyczne  $SF < 1$ . Do wykrywania interakcji pomiędzy analizowanymi czynnikami zastosowano także program Multifactor Dimensionality Reduction (MDR).

#### 3.3.14.1 Analiza interakcji z zastosowaniem programu *Multifactor Dimensionality Reduction*

Program Multifactor Dimensionality Reduction (MDR, <http://www.epistasis.org/open-source-mdr-project.html>) wykorzystano do identyfikacji potencjalnych nieliniowych interakcji pomiędzy badanymi loci oraz określenia ich charakteru (oddziaływanie synergistyczne, nakładające się – *redundant*, itp.). Program MDR testuje kombinacje czynników, które samodzielnie mogą nie wywierać znaczących efektów (Ritchie i wsp., 2001). Program dokonuje redukcji wymiarów badanych kombinacji zmiennych, dzieląc je na dwa rodzaje - zmienne niskiego i wysokiego ryzyka zachorowania. Spośród zadanych zmiennych MDR identyfikuje najlepszy model o maksymalnej dokładności, oszacowanej przez parametr zrównoważonej dokładności dla próby testowanej (*Testing Balanced Accuracy*) i najwyższej wartości spójności walidacji krzyżowej (*Cross-validation consistency*, CVC). Wartość parametru CVC wskazuje na to, ile razy dana kombinacja zmiennych/loci została zidentyfikowana w badanym fragmencie całej testowanej próby (*testing set*). Domyślnie MDR dzieli bazę na 10 fragmentów i w każdym z nich sprawdza zasadność badanej kombinacji zmiennych/loci.

Poddano analizie modele składające się z jednej, dwóch, trzech oraz czterech zmiennych, przy dziesięciokrotnej walidacji krzyżowej. Z uwagi na dużą ilość rozpatrywanych zmiennych stosowano filtr, selekcyjujący wstępnie zmienne (ReliefF). Rozpatrywano modele o dokładności wyższej niż 0,5.

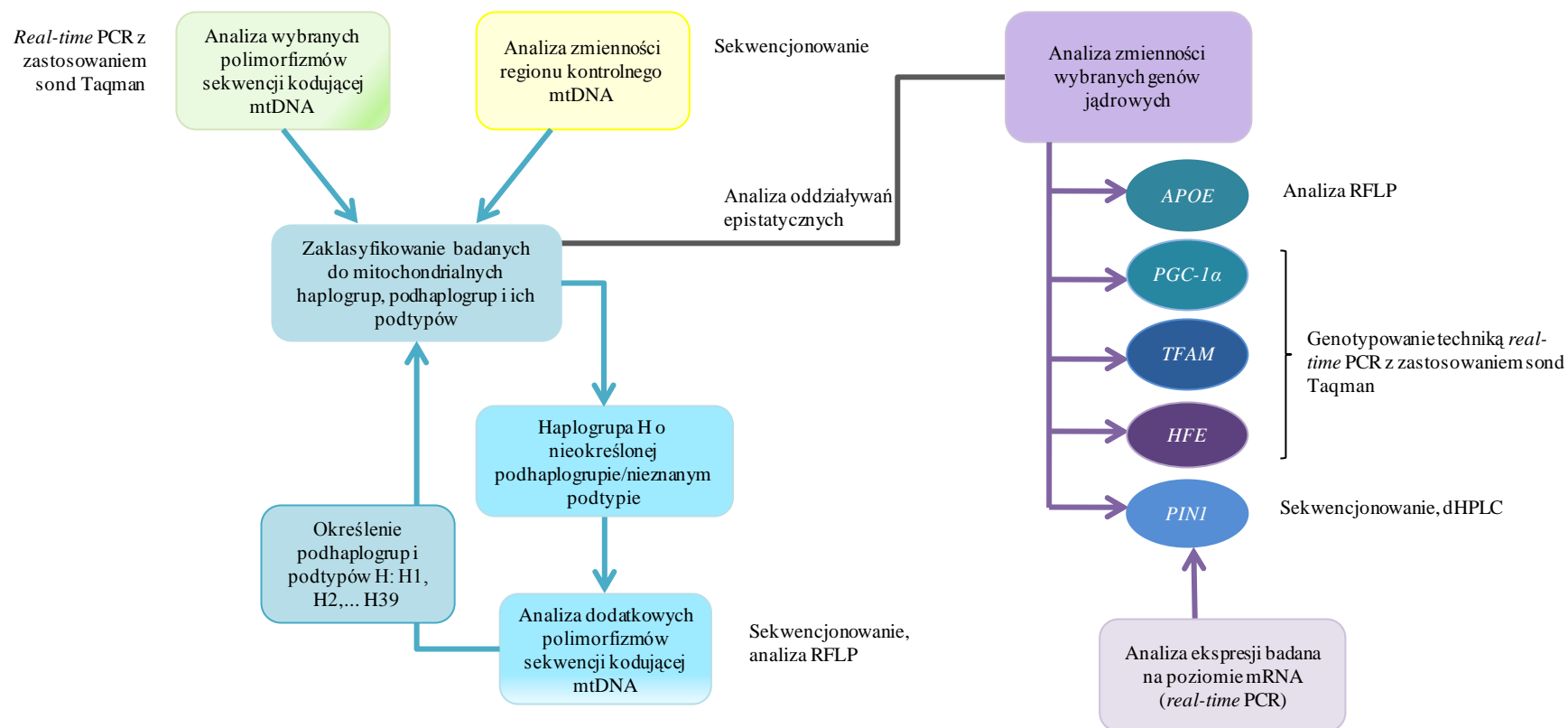
### **3.3.14.2 Analiza haplotypów z zastosowaniem programu Haploview**

Analiza i wizualizacja haplotypów tworzonych przez warianty genów *PIN1*, *TFAM* oraz *HFE* została wykonana z wykorzystaniem programu Haploview 4.0 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). Nierównowaga sprzężeń (*linkage disequilibrium*, LD) pomiędzy parami alleli polimorfizmów, wyrażona współczynnikiem  $D'$  (tzw. znormalizowany współczynnik nierównowagi), została obliczona z zastosowaniem tego samego programu.

### **3.3.14.3 Metaanaliza z zastosowaniem programu Meta-DiSc**

Program Meta-Disc ([http://www.hrc.es/investigacion/metadisc\\_en.htm](http://www.hrc.es/investigacion/metadisc_en.htm)) został wykorzystany do porównania wyników kilku badań dotyczących tej samej zmiennej. Pozwala także sprawdzić m.in. heterogeniczność próby.

Na Rycinie 11 przedstawiono kolejne etapy prowadzonych badań wraz z głównymi zastosowanymi technikami.



Ryc. 11. Główne etapy analizy badanych fragmentów genomu mitochondrialnego i jądrowego.



## 4 WYNIKI

Najpierw przedstawiono wyniki badania zmienności mtDNA, a następnie analizy zmienności wybranych genów jądrowych. Wyjątkiem jest przedstawienie na samym początku wyników analizy częstości alleli apolipoproteiny E, *APOE2*, *APOE3* i *APOE4*, ponieważ w dalszej części tego rozdziału grupy badane dzielono ze względu na nosicielstwo allelu *APOE4*. Kolorem czerwonym zaznaczono w tabelach wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Pod podrozdziałami przedstawiono krótkie podsumowanie uzyskanych wyników.

### 4.1 Allel *APOE4* znanym czynnikiem ryzyka zachorowania na LOAD

Częstość alleli *APOE* jest istotnie różna pomiędzy grupą chorych z LOAD a grupą kontrolną ( $p < 0,0001$ ,  $\chi^2 = 96,2$ ,  $df = 2$ ). Stwierdzono, że allel *APOE4* jest istotnym czynnikiem ryzyka LOAD ( $p < 0,0001$ ), natomiast allele *APOE2* i *APOE3* są powiązane ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania w badanej grupie (odpowiednio  $p = 0,0007$  oraz  $p < 0,0001$ , Tab. 5). W związku z tym, w dalszych analizach podzielono grupy badane, uwzględniając nosicielstwo *APOE4*. Osoby posiadające co najmniej jeden allel *APOE4* oznaczono jako *APOE4+*, natomiast osoby bez allelu *APOE4* – oznaczono jako *APOE4-*.

**Tabela 5.** Częstości genotypów i alleli *APOE* w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej.

<i>APOE</i>	Chorzy z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	Test $\chi^2$ , df=1
<b>Genotypy</b>			
<i>APOE2/2</i>	0 (0,0)	4 (1,26)	
<i>APOE2/3</i>	24 (5,69)	35 (11,01)	
<i>APOE2/4</i>	8 (1,90)	7 (2,20)	
<i>APOE3/3</i>	159 (37,68)	215 (67,61)	
<i>APOE3/4</i>	204 (48,34)	54 (16,98)	
<i>APOE4/4</i>	27 (6,39)	3 (0,94)	
<b>Allele</b>			
<i>APOE2</i>	32 (3,79)	50 (7,86)	$p = 0,0007$ , OR=0,46, 95% CI 0,29-0,73
<i>APOE3</i>	546 (64,69)	519 (81,60)	$p < 0,0001$ , OR=0,41, 95% CI 0,32-0,53
<i>APOE4</i>	266 (31,52)	67 (10,54)	$p < 0,0001$ , OR=3,91, 95% CI 2,92-5,23

Stwierdzono statystycznie istotny wpływ nosicielstwa przynajmniej jednego allelu *APOE4* (status *APOE4+*) na wzrost ryzyka zachorowania na LOAD (Tab. 6). W całej grupie badanej, a także po podzieleniu jej ze względu na płeć, status *APOE4+* jest związany z ponad pięciokrotnym wzrostem ryzyka zachorowania (Tab. 6).

**Tabela 6.** Porównanie liczby nosicieli allelu ryzyka LOAD, *APOE4*, w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej, podzielonych ze względu na płeć.

	<i>APOE4</i> , n (%)	<i>APOE4+</i> , n (%)	Test $\chi^2$ , df=1
<b>Wszyscy badani</b>			
Chorzy z LOAD	181 (42,9)	241 (57,1)	p<0,0001, OR=5,28, 95% CI 3,78-7,39
Grupa kontrolna	254 (79,9)	64 (20,1)	
<b>Kobiety</b>			
Chore z LOAD	121 (44,5)	151 (55,5)	p<0,0001, OR=5,28, 95% CI 3,51-7,92
Grupa kontrolna	186 (80,9)	44 (19,1)	
<b>Mężczyźni</b>			
Chorzy z LOAD	60 (40,0)	90 (60,0)	p<0,0001, OR=5,10, 95% CI 2,81-9,26
Grupa kontrolna	68 (77,3)	20 (22,7)	

#### 4.1.1 Wpływ statusu *APOE4+* na wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD

Stwierdzono, że status *APOE4+* jest związany z wcześniejszym wystąpieniem objawów LOAD ( $p=0,007$ , Tab. 7). Po podzieleniu badanych ze względu na płeć jedynie w grupie kobiet otrzymano związek statusu *APOE4+* z wcześniejszym pojawieniem się pierwszych objawów ( $p=0,0035$ ). W mniej licznej grupie mężczyzn nie stwierdzono istotnej różnicy w wartości średniej wieku pojawienia się pierwszych objawów LOAD pomiędzy osobami *APOE4+* i *APOE4-* ( $p=0,536$ ).

**Tabela 7.** Uśredniony wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD a nosicielstwo allelu *APOE4* (status *APOE4+* vs status *APOE4-*).

	<i>APOE4</i> , n (%)	<i>APOE4+</i> , n (%)	Test Manna-Whitneya
<b>Wszyscy badani</b>			
Liczba nosicieli, n (%)	181 (42,9)	241 (57,1)	p=0,007
Średni wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD ( $\pm$ SD)	75,3 $\pm$ 6,08	74,0 $\pm$ 5,11	
<b>Kobiety chore na AD</b>			
Liczba nosicielek, n (%)	121 (44,5)	151 (55,5)	p=0,0035
Średni wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD ( $\pm$ SD)	75,5 $\pm$ 6,41	73,6 $\pm$ 5,08	
<b>Mężczyźni chorzy na AD</b>			
Liczba nosicieli, n (%)	60 (40,0)	90 (60,0)	p=0,536
Średni wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD ( $\pm$ SD)	75,1 $\pm$ 5,37	74,6 $\pm$ 5,12	

Następnie, uwzględniając wartość średnią i medianę dla wieku (w przypadku chorych na LOAD – wieku wystąpienia pierwszych objawów, w przypadku grupy kontrolnej – wieku badania), podzielono grupę badaną na dwie podgrupy. Średni wiek dla całej grupy badanej (chorzy na LOAD oraz grupa kontrolna) wynosi 72,8 $\pm$ 5,99 lat, natomiast mediana (Me) dla wieku wynosi 72 lata. Dlatego podzielono wszystkich badanych na dwie podgrupy, o wieku  $\leq 72$  lata oraz  $> 72$  lat. W grupie kobiet średni wiek wynosi 72,5 $\pm$ 6,3 (Me=72 lata), stąd podzielono je na dwie podgrupy wiekowe  $< 72$  lat oraz  $\geq 72$  lat. Natomiast w grupie mężczyzn średni wiek wynosi 73,3 $\pm$ 5,51 lata (Me=73 lata). Dlatego podzielono ich na tych o wieku  $< 73$  lat oraz starszych, o wieku  $\geq 73$  lata.

**Tabela 8.** Udział nosicielstwa allelu *APOE4* w zachorowaniu na LOAD w całej grupie badanej podzielonej według wieku.

Zmienne		Chorzy z LOAD, n	Grupa kontrolna, n	Chorzy z LOAD vs grupa kontrolna		
Wiek	<i>APOE</i>			<i>p</i>	OR	95% CI
≤72 lata	<i>APOE4+</i>	102	49	<0,0001	6,28	4,00-9,87
	<i>APOE4-</i>	58	175			
>72 lata	<i>APOE4+</i>	135	15	<0,0001	5,65	3,08-10,4
	<i>APOE4-</i>	121	76			

Nosiciele allelu *APOE4*, w wieku ≤72 lata charakteryzuje ponad sześciokrotnie wyższe ryzyko LOAD niż osób o statusie *APOE4-* (Tab. 8). Wartość ilorazu szans była tylko nieznacznie niższa w grupie wiekowej >72 r.ż. Wykazano, że kobiety obciążone przynajmniej jednym allelem *APOE4* oraz mające <72 lat mają dziewięciokrotnie wyższe ryzyko LOAD w porównaniu z tymi o statusie *APOE4-* ( $p < 0,0001$ , Tab. 9). W starszej grupie wiekowej (≥72 lat) ryzyko zachorowania u nosicielek *APOE4* jest niższe, ale nadal istotne statystycznie ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 9.** Udział wieku oraz nosicielstwa allelu *APOE4* w zachorowaniu na LOAD w grupie kobiet.

Zmienne		Kobiety z LOAD, n	Kobiety z grupy kontrolnej, n	Kobiety z LOAD vs z grupy kontrolnej		
Wiek	<i>APOE</i>			<i>p</i>	OR	95% CI
<72 lata	<i>APOE4+</i>	61	30	<0,0001	9,00	4,94-16,4
	<i>APOE4-</i>	28	124			
≥72 lata	<i>APOE4+</i>	90	14	<0,0001	4,29	2,24-8,20
	<i>APOE4-</i>	93	62			

Mężczyźni w wieku <73 lat i będący nosicielami przynajmniej jednego allelu *APOE4* mają ponad 4,5 razy wyższe ryzyko zachorowania na LOAD w porównaniu z mężczyznami nie posiadającymi tego allelu. U starszych mężczyzn (≥73 lata) ryzyko zachorowania u nosicielek *APOE4* jest siedmiokrotnie wyższe niż u tych o statusie *APOE4-* (Tab. 10).

**Tabela 10.** Udział allelu *APOE4* w zachorowaniu na LOAD w grupie mężczyzn podzielonych według wieku.

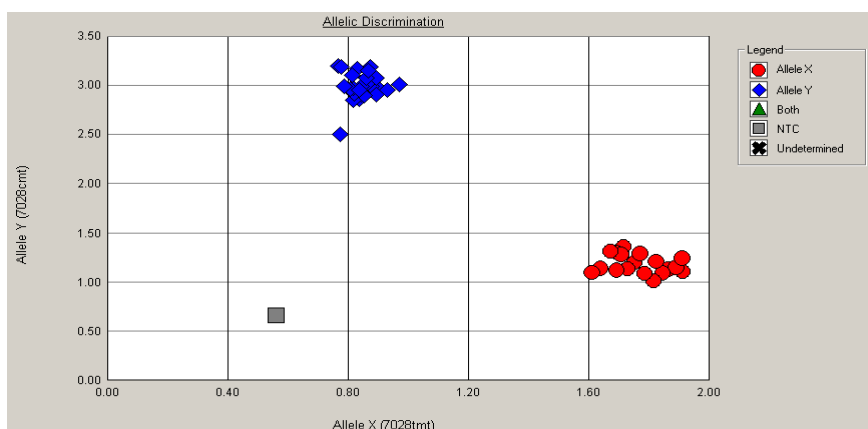
Zmienne		Mężczyźni z LOAD, n	Mężczyźni z grupy kontrolnej, n	Mężczyźni z LOAD vs z grupy kontrolnej		
Wiek	<i>APOE</i>			<i>p</i>	OR	95% CI
<73 lata	<i>APOE4+</i>	33	15	<0,0001	4,61	2,07-10,3
	<i>APOE4-</i>	21	44			
≥73 lata	<i>APOE4+</i>	57	5	<0,0001	7,02	2,46-20,0
	<i>APOE4-</i>	39	24			

➤ Podsumowując, dokonano stratyfikacji grup badanych pod względem nosicielstwa allelu *APOE4*. Jednocześnie potwierdzono wpływ allelu *APOE4* na zwiększanie ryzyka LOAD.

## 4.2 Wpływ zmienności mtDNA na ryzyko AD

### 4.2.1 Identyfikacja haplogrup, podhaplogrup i podtypów mtDNA

Dla każdego badanego została wykonana analiza wybranych polimorfizmów sekwencji kodującej mtDNA, których poszczególne allele pozwalają określić przynależność do jednej z dziewięciu typowych dla populacji kaukaskiej haplogrup (H, I, J, K, T, U, V, W, X). Genotypowanie wykonano techniką TaqMan, przykładowy wynik przedstawiono na Ryc. 12.



**Ryc. 12.** Przykładowy wynik genotypowania z zastosowaniem techniki TaqMan. Do analizy zastosowano program SDS 2.0 – tu dla określenia alleli polimorfizmu m.7028C>T. Kolorem niebieskim zaznaczony jest allel 7028C, czerwonym – allel 7028T, natomiast szarym brak amplifikacji - kontrole negatywne.

W Tabeli 11 zestawiono dziewięć polimorfizmów wykorzystanych do określenia charakterystycznych dla populacji kaukaskiej haplogrup mtDNA. Dla przykładu, osoba należąca do haplogrupy W jest nosicielem alleli m.7028T, m.10398A oraz m.8251A.

**Tabela 11.** Zestawienie polimorfizmów regionu kodującego mtDNA do oznaczania charakterystycznych dla populacji kaukaskiej haplogrup mitochondrialnych. W kolumnach podano tylko te allele, które są istotne dla identyfikacji konkretnej haplogrupy.

Haplogrupa	m.7028 C>T	m.10398 A>G	m.13708 G>A	m.1719 G>A	m.4580 G>A	m.8251 G>A	m.12308 A>G	m.9055 G>A	m.13368 G>A
H	C	A							
I	T	G		A		A			
J	T	G	A						
K	T	G					G	A	
T	T	A							A
U	T	A					G		
V	T	A			A				
W	T	A				A			
X	T	A		A					

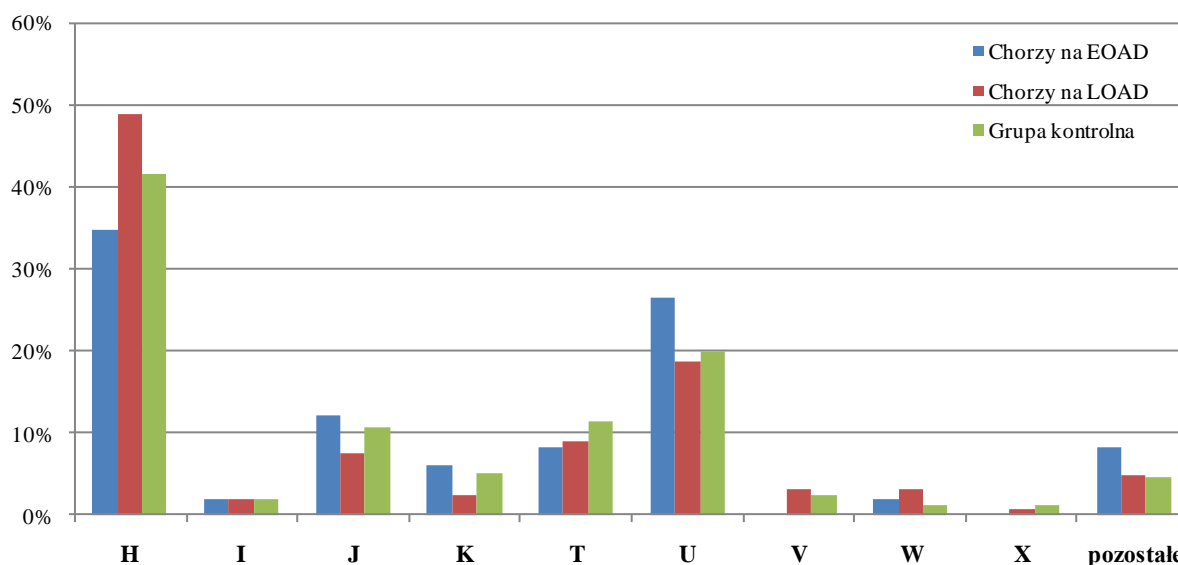
Osoby posiadające zestaw alleli polimorfizmów przedstawionych w Tab. 11, niepozwalający na przypisanie im żadnej z dziewięciu najczęstszych haplogrup specyficznych dla populacji kaukaskiej, oznaczano terminem “inne”.

Następnym etapem analizy było oznaczenie sekwencji regionu kontrolnego (RK) mtDNA, co pozwoliło 1. zweryfikować haplogrupy określone na podstawie polimorfizmów regionu kodującego, 2. podzielić haplogrupy na podhaplogrupy i ich podtypy, a także 3. porównać zmienność RK u chorych na AD i w grupie kontrolnej. Dla przykładu, osoba zaklasyfikowana na podstawie analizy polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA do haplogrupy H, posiadająca w RK polimorfizmy m.16311T>C oraz m.195T>C, należy do podhaplogrupy H11. Jeśli dodatkowo jest nosicielką polimorfizmu m.16293A>G, należy do H11a.

Analizę zmienności wybranych regionów w mtDNA przeprowadzono w kilku etapach, przedstawionych na Ryc. 11. Z uwagi na to, że haplogrupa H jest najbardziej zróżnicowaną haplogrupą charakterystyczną dla populacji kaukaskiej, a ponadto jest także jedną z najczęstszych haplogrup w badanej populacji, wykonano bardziej szczegółową analizę jej podhaplogrup i podtypów, zwłaszcza tych, dla których określenia nie wystarczy sekwencjonowanie RK.

#### 4.2.1.1 Haplogrupa H jest najczęstszą haplogrupą we wszystkich badanych grupach

Analiza wybranych polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA oraz sekwencjonowanie RK pozwoliły przypisać większości badanych jedną z dziewięciu charakterystycznych haplogrup dla populacji kaukaskiej. Najczęstszą haplogrupą zarówno w grupie LOAD (48,82%), jak i w grupie kontrolnej (41,51%) była haplogrupa H (Ryc. 13).



**Ryc. 13. Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie chorych z EOAD (N=49), LOAD (N=422) oraz w grupie kontrolnej (N=318).** Osoby należące do innych haplogrup i makrohaplogrup (HV1, HV0, R, R0, N, M, L2) oraz o nieprzypisanych haplogrupach zgrupowano razem i określono terminem “pozostałe”.

Również w grupie EOAD najczęstszą haplogrupą była H (34,7%). Drugą co do częstości we wszystkich badanych grupach była haplogrupa U.

Po jednej osobie z grupy kontrolnej zaklasyfikowano do makrohaplogrupy R i R0 (Tab. S12, Supplement), gdyż nie było możliwe przypisanie im niższej jednostki filogenetycznej. Trzy osoby z grupy kontrolnej określono jako należące do kategorii “inne”, gdyż analiza sekwencji RK i wybranych polimorfizmów regionu kodującego mtDNA nie pozwoliła na jednoznaczne przypisanie im żadnej dotychczas opisywanej w literaturze haplogrupy. Prawdopodobnie doszło u nich do mutacji powrotnej w *locus* wykorzystywanym do określania haplogrup. Ponadto, allele polimorfizmów w RK u tych osób nie tworzą specyficznego wzoru dla żadnej haplogrupy, także spoza populacji kaukaskiej.

Poza haplogrupami specyficznymi dla populacji kaukaskiej zarówno w grupie kontrolnej, jak i wśród chorych na AD, stwierdzono także obecność haplogrup charakterystycznych dla populacji wschodnio - (A8, C, D4/G, G2a1, Y1b) i południowo-azjatyckiej (M37) oraz afrykańskiej (L2). Obecność tych rzadkich haplogrup jest ciekawa z punktu widzenia historycznego. Może świadczyć o migracjach ludzkości, do których mogło dojść na terenie Polski np. po zsyłkach na Syberię po powstaniu styczniowym (jak w przypadku haplogrupy C, charakterystycznej dla populacji zamieszkujących Syberię). Kwestie te pozostają jednak poza tematem niniejszej rozprawy.

Asocjacje istotne statystycznie dotyczące mitochondrialnych haplogrup przeanalizowano także dla grup pozbawionych domieszki haplogrup innych niż kaukaskie i – jeśli wpłynęło to na wynik- zostało to opisane.

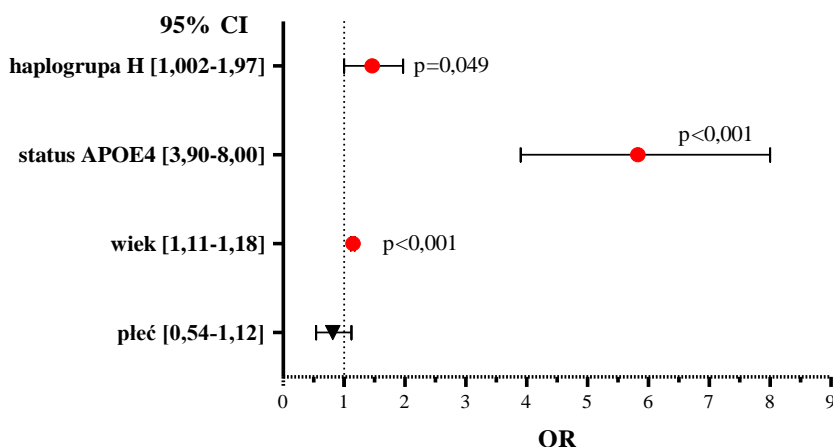
#### 4.2.1.2 Haplogrupa H jest związana z wyższym ryzykiem LOAD

W analizie jednoczynnikowej uzyskano, że haplogrupa H jest istotnie statystycznie powiązana z wyższym ryzykiem zachorowania na LOAD ( $p=0,048$ , Tab. 12) w całej grupie badanej oraz osobno w grupie kobiet ( $p=0,049$ ). Natomiast jeśli z grupy badanej usunie się nosicieli haplogrup stanowiących domieszki niespecyficzne dla populacji kaukaskiej, w analizie jednoczynnikowej istotność związku haplogrupy H z ryzykiem zachorowania na LOAD nieznacznie wzrasta ( $p=0,041$ , OR=1,36, 95% CI 1,01-1,83), także osobno w grupie kobiet ( $p=0,042$ , OR=1,45, 95% CI 1,01-2,07). W wieloczynnikowej analizie regresji logistycznej, uwzględniającej w modelu wpływ nosicielstwa allelu *APOE4*, wiek, płeć oraz haplogrupę H, uzyskano, że rola haplogrupy H w zachorowaniu na LOAD jest na granicy istotności statystycznej ( $p=0,059$ ).

**Tabela 12.** Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy związku głównych haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej z ryzykiem LOAD w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. Analiza jednoczynnikowa została wykonana z wykorzystaniem testu  $\chi^2$  lub dokładnego dwustronnego testu Fishera.

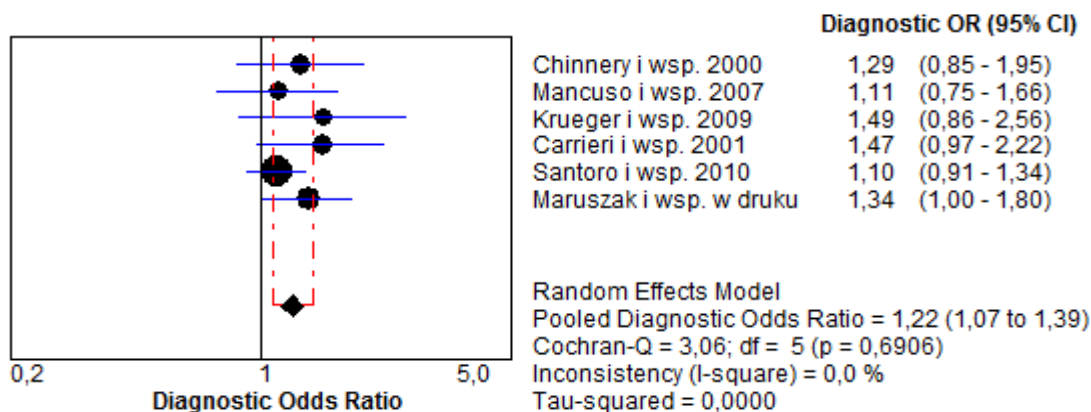
Haplogrupa	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI
<b>H</b>	<b>0,048</b>	1,34	1,01-1,80	<b>0,049</b>	1,43	1,001-2,30	0,535	1,18	0,70-2,01
<b>I</b>	1,00	1,00	0,36-2,80	0,524	0,56	0,15-2,00	0,300	5,44	0,29-102
<b>J</b>	0,142	0,68	0,41-1,14	0,597	0,84	0,44-1,60	0,083	0,46	0,20-1,04
<b>K</b>	0,068	0,46	0,01-1,02	0,230	0,53	0,20-1,38	0,150	0,34	0,08-1,45
<b>T</b>	0,299	0,77	0,48-1,25	<b>0,010</b>	0,43	0,23-0,82	0,132	1,99	0,81-4,87
<b>U</b>	0,709	0,93	0,64-1,35	0,791	1,06	0,69-1,64	0,589	0,81	0,40-1,64
<b>V</b>	0,823	1,23	0,50-3,01	1,00	0,99	0,33-2,98	0,714	1,79	0,35-9,08
<b>W</b>	0,137	2,50	0,81-7,73	0,240	2,59	0,69-9,68	0,654	2,38	0,26-21,70
<b>X</b>	0,471	0,56	0,12-2,53	1,00	1,27	0,21-7,68	0,136	0,11	0,005-2,42

Jednakże, jeśli ponownie usunie się z grupy badanej nosicieli haplogrup innych niż charakterystyczne dla populacji kaukaskiej, analiza regresji logistycznej identyfikuje na tle pozostałych czynników (status *APOE4*, wiek oraz – w przypadku całej grupy badanej - płeć) słaby, ale istotny statystycznie wpływ haplogrupy H na ryzyko zachorowania na LOAD (Ryc. 14), zarówno w całej grupie ( $p=0,049$ ,  $OR=1,41$ , 95% CI 1,002-1,97), jak też osobno w grupie kobiet ( $p=0,049$ ,  $OR=1,51$ , 95% CI 1,002-2,27). Otrzymany związek haplogrupy H z ryzykiem LOAD jest spójny z wynikami wcześniej opublikowanymi dla mniejszej grupy badanej (Maruszak i wsp., 2009a).



Ryc. 14. Wyniki wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (status *APOE4*, płeć, wiek, nosicielstwo haplogrupy H), przeprowadzonej w grupach LOAD i kontrolnej, z których wykluczono nosiciele niespecyficznych dla populacji kaukaskiej haplogrup.

Na Rycinie 15 przedstawiono wyniki metaanalizy roli haplogrupy H w zachorowaniu na AD, z wykorzystaniem danych pochodzących z pięciu opublikowanych badań oraz opisanych w niniejszej rozprawie (łącznie 2093 chorych vs 1742 osób zdrowych).



Ryc. 15. Metaanaliza związku haplogrupy H z ryzykiem AD w sześciu badaniach, włącznie z opisywanym w niniejszej rozprawie (Maruszak i wsp., w druku). Wykres typu *forest plot* przedstawia wartość ilorazu szans (*Diagnostic OR*) oraz przedział ufności (95% CI) uzyskany dla asocjacji haplogrupy H z ryzykiem AD w każdym z badań włączonych do metaanalizy. Ich autorzy zostali przedstawieni po prawej stronie ryciny. Podsumowanie wszystkich cytowanych badań oznaczono symbolem diamentu (♦). Wynik metaanalizy przedstawia tzw. *Pooled Diagnostic OR*. Wartość Q-testu Cochran'a oraz parametru *I-square* obrazuje poziom heterogeniczności próby, parametr *Tau-square* opisuje wariancję między badaniami. Wartości te wskazują na niską heterogeniczność i niski poziom wariancji między badaniami.



W metaanalizie, poza opisywanymi tutaj wynikami, uwzględniono tylko te badania, w których podano częstość haplogrupy H (Chinnery i wsp., 2000, Mancuso i wsp., 2007, Krüger i wsp., 2009; Carrieri i wsp., 2001, Santoro i wsp., 2010). Metaanaliza wykazała, że haplogrupa H jest istotnym, choć słabym, czynnikiem ryzyka AD (OR=1,22, 95% CI 1,07-1,39) w populacji kaukaskiej.

#### 4.2.1.3 Haplogrupa T zmniejsza ryzyko LOAD u kobiet

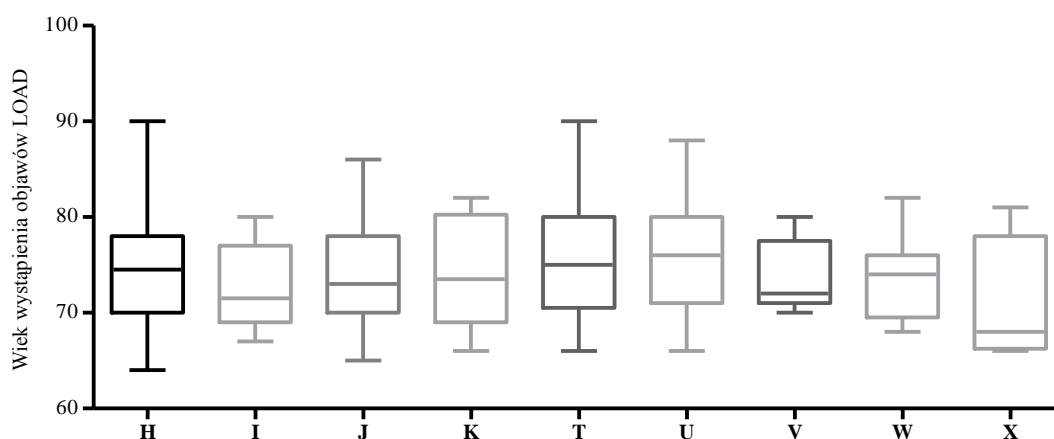
Analiza częstości haplogrup, przedstawiona w Tab. 12, wykazała, że haplogrupa T jest czynnikiem związanym z obniżonym ryzykiem LOAD w grupie kobiet ( $p=0,010$ ). Protekcyjna rola haplogrupy T została potwierdzona po przeprowadzeniu wieloczynnikowej analizy regresji ( $p=0,009$ , OR=0,38, 95% CI 0,19-0,79). Natomiast w całej grupie badanej nie stwierdzono związku haplogrupy T z mniejszym ryzykiem LOAD.

#### 4.2.1.4 Brak wpływu haplogrup mitochondrialnych na ryzyko EOAD

Nie stwierdzono związku żadnej ze specyficznych dla populacji kaukaskiej haplogrup z ryzykiem EOAD ( $p>0,05$ ). W Tabeli S13 (Suplement) zestawiono wyniki analizy jednoczynnikowej dla haplogrup H, J, K, T oraz U, z zastosowaniem dwustronnego dokładnego testu Fishera. Dla haplogrup I, V, W oraz X nie wykonano obliczeń statystycznych ze względu na zbyt niską częstość w grupie EOAD ( $n=1$  lub  $n=0$ , Ryc. 13). Podobnie, z uwagi na niską liczebność grupy EOAD nie sprawdzano też częstości haplogrup oddzielnie w grupie kobiet i mężczyzn.

#### 4.2.1.5 Brak związku między posiadaną haplogrupą mitochondrialną a wiekiem zachorowania na LOAD

Nie stwierdzono różnic w wieku zachorowania na LOAD u nosicieli charakterystycznych dla populacji kaukaskiej haplogrup (test Kruskala-Wallisa,  $p=0,208$ ; Ryc. 16).



Ryc. 16. Wykres typu ramka-wąsy przedstawiający wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD u nosicieli różnych mitochondrialnych haplogrup, charakterystycznych dla populacji kaukaskiej.



Również w grupie chorych z EOAD nie stwierdzono różnicy w wieku pojawienia się pierwszych objawów u nosicieli różnych haplogrup mtDNA ( $p=0,949$ ).

➤ Podsumowując, haplogrupa H stanowi czynnik ryzyka LOAD w całej grupie badanej. W grupie kobiet haplogrupa T stanowi czynnik protekcyjny. Nie stwierdzono związku nosicielstwa którejkolwiek z haplogrup mitochondrialnych charakterystycznych dla populacji kaukaskiej z ryzykiem EOAD. Nie wykazano związku haplogrup mitochondrialnych z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów LOAD i EOAD.

#### 4.2.1.6 Haplogrupy a nosicielstwo allelu *APOE4*

Wykonano analizę częstości haplogrup H, I, J, K, T, U, V, W oraz X w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej, uwzględniając status *APOE4*. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach haplogrup typowych dla populacji kaukaskiej u osób o statusie *APOE4-* w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 13).

**Tabela 13.** Częstości mitochondrialnych haplogrup u nosicieli allelu *APOE4* (status *APOE4+*) oraz u osób o statusie *APOE4-* w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K). Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu  $\chi^2$  bądź dokładnego dwustronnego testu Fishera.

Haplogrupa	status <i>APOE4+</i>		Nosiciele danej haplogrupy i <i>APOE4+</i> vs pozostali nosiciele <i>APOE4+</i>			status <i>APOE4-</i>		Nosiciele danej haplogrupy o statusie <i>APOE4-</i> vs pozostali nosiciele <i>APOE4-</i>		
	LOAD	K	<i>p</i>	OR	95% CI	LOAD	K	<i>p</i>	OR	95% CI
	n	n				n	n			
<b>H</b>	120	24	0,082	1,65	0,94-2,91	86	108	0,302	1,22	0,83-1,80
<b>I</b>	4	1	1,00	1,06	0,12-9,69	4	5	1,00	1,13	0,30-4,25
<b>J</b>	17	6	0,539	0,73	0,28-1,94	15	28	0,347	0,73	0,38-1,41
<b>K</b>	4	6	<b>0,007</b>	0,16	0,04-0,60	6	10	0,801	0,84	0,30-2,35
<b>T</b>	20	9	0,167	0,55	0,24-1,28	18	27	1,00	1,01	0,53-1,92
<b>U</b>	47	11	0,675	1,17	0,57-2,41	32	52	0,467	0,83	0,51-1,36
<b>V</b>	8	0	0,211	4,70	0,27-82,5	5	8	1,00	0,87	0,28-2,72
<b>W</b>	5	1	1,00	1,33	0,15-11,6	8	3	0,058	3,87	1,01-14,8
<b>X</b>	4	3	0,163	0,34	0,07-1,57	0	1	1,00	0,47	0,02-11,5

Wykazano, że w grupie osób *APOE4+* haplogrupa K jest związana ze zmniejszonym ryzykiem LOAD (OR=0,16). Wynik ten potwierdzono wykonując wieloczynnikową analizę regresji logistycznej, uwzględniając także wpływ płci i wieku ( $p=0,014$ , OR=0,18, 95% CI 0,04-0,70).

Status *APOE4+* jest związany z istotnie wyższym ryzykiem LOAD w obrębie haplogrup H, J, T, U i V (Tab. 14). Dla pozostałych haplogrup niskie liczebności uniemożliwiły precyzyjne oszacowanie ryzyka, co obrazują szerokie granice przedziałów OR. Iloraz szans uzyskany osobno dla *APOE4* (5,28) zawiera się we wszystkich przedziałach istotności.

**Tabela 14.** Wpływ nosicielstwa poszczególnych haplogrup mitochondrialnych na oddziaływanie allelu *APOE4* na ryzyko LOAD. Analiza statystyczna została wykonana z wykorzystaniem testu  $\chi^2$  lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

Haplogrupa	Grupa kontrolna		p
	Grupa LOAD	<i>APOE4+</i> / <i>APOE4-</i> (n/n)	
H	120/86	24/108	<0,0001 [OR=6,28, 95% CI 3,73-10,6]
I	4/4	1/5	0,301 [OR=5,0, 95% CI 0,39-64,4]
J	17/15	6/28	0,004 [OR=5,29, 95% CI 1,72-16,3]
K	4/6	6/10	1,00 [OR=1,11, 95% CI 0,22-5,62]
T	20/18	9/27	0,018 [OR=3,33, 95% CI 1,24-8,95]
U	47/32	11/52	<0,0001 [OR=6,94, 95% CI 3,15-15,3]
V	8/5	0/8	0,007 [OR=26,3, 95% CI 1,25-554]
W	5/8	1/3	1,00 [OR=1,88, 95% CI 0,15-23,4]
X	4/0	3/1	1,00 [OR=3,86, 95% CI 0,12-127]

➤ Podsumowując, haplogrupa K jest związana z neutralizowaniem wpływu nosicielstwa przynajmniej jednego allelu *APOE4* (p=0,014).

#### 4.2.2 Analiza częstości wybranych polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA

Jednoczynnikowa analiza częstości alleli polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA, służących do klasyfikacji badanych do haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej, wykazała istotny statystycznie związek allelu m.9055A z niższym ryzykiem LOAD (p=0,005, Tab. 15). Wynik ten potwierdzono z zastosowaniem wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (uwzględniającej nosicielstwo allelu *APOE4*, m.9055G>A, płeć oraz wiek) (por. Tab. 16).

**Tabela 15.** Wyniki jednoczynnikowej analizy częstości polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną, także po podzieleniu badanych ze względu na płeć. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu  $\chi^2$  lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

Polimorfizm mtDNA	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
m.7028C>T	0,086	1,30	0,96-1,73	0,062	1,40	0,98-1,99	0,779	1,08	0,64-1,83
m.10398A>G	0,087	1,40	0,95-2,07	0,293	1,30	0,80-2,10	0,104	1,73	0,89-3,35
m.13708G>A	0,204	0,75	0,48-1,17	0,976	1,01	0,58-1,75	0,022	0,40	0,18-0,87
m.1719G>A	0,943	0,98	0,54-1,79	0,990	1,00	0,50-2,00	0,966	1,03	0,29-3,62
m.4580G>A	0,644	1,23	0,50-3,02	0,986	0,99	0,33-2,99	0,481	1,79	0,35-9,08
m.8251G>A	0,225	1,46	0,79-2,67	0,283	1,47	0,73-3,00	0,504	1,50	0,46-4,93
m.12308A>G	0,302	0,84	0,59-1,17	0,769	0,94	0,63-1,40	0,223	0,67	0,35-1,28
m.9055G>A	0,005	0,39	0,20-0,75	0,048	0,45	0,20-0,99	0,040	0,27	0,08-0,94
m.13368G>A	0,250	0,75	0,46-1,22	0,010	0,43	0,23-0,82	0,168	1,88	0,77-4,63

W grupie kobiet analiza jednoczynnikowa wykazała istotny statystycznie związek allelu m.9055A (p=0,048), podobnie jak w całej grupie badanej, oraz allelu m.13368A (p=0,010) z niższym ryzykiem zachorowania na LOAD. W wieloczynnikowej analizie regresji logistycznej udział allelu m.9055A w zmniejszaniu ryzyka zachorowania na LOAD w grupie kobiet utracił istotność statystyczną, choć wartość OR była podobna jak w analizie jednoczynnikowej (Tab. 16). Natomiast analiza wieloczynnikowa potwierdziła protekcyjną rolę allelu m.13368A w grupie kobiet (p=0,009). Allel m.13368A definiuje haplogrupę T, wyżej opisaną jako czynnik protekcyjny dla osób płci żeńskiej.

**Tabela 16.** Wyniki analizy regresji logistycznej, uwzględniającej zmienne niezależne: status *APOE4* (+/-), płeć, wiek oraz polimorfizm w regionie kodującym mtDNA. Analiza była prowadzona w całej grupie badanej (grupa LOAD, grupa kontrolna) oraz po podzieleniu badanych ze względu na płeć.

Polimorfizm mtDNA	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
m.7028C>T	0,114	1,31	0,94-1,84	0,081	1,44	0,96-2,16	0,857	1,06	0,58-1,94
m.10398A>G	0,442	1,19	0,76-1,85	0,620	1,15	0,66-1,99	0,542	1,26	0,60-2,66
m.13708G>A	0,651	0,89	0,53-1,48	0,776	1,09	0,59-2,05	0,247	0,59	0,24-1,44
m.1719G>A	0,417	0,75	0,38-1,49	0,660	0,84	0,38-1,84	0,386	0,55	0,14-2,11
m.4580G>A	0,434	1,49	0,55-4,09	0,950	1,04	0,29-3,73	0,250	2,83	0,48-16,69
m.8251G>A	0,132	1,71	0,85-3,43	0,139	1,85	0,82-4,19	0,661	1,34	0,36-5,01
m.12308A>G	0,278	0,80	0,54-1,19	0,893	0,97	0,61-1,55	0,068	0,49	0,23-1,05
m.9055G>A	<b>0,004</b>	0,33	0,16-0,70	0,101	0,47	0,19-1,16	<b>0,008</b>	0,16	0,04-0,62
m.13368G>A	0,120	0,64	0,37-1,12	<b>0,009</b>	0,38	0,18-0,79	0,292	1,73	0,62-4,82

Także w grupie mężczyzn stwierdzono związek m.9055A z niższym ryzykiem LOAD (Tab. 15, Tab. 16). Wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej nie potwierdziła związku allelu m.13708A ze zmniejszonym prawdopodobieństwem LOAD w grupie mężczyzn, uzyskanego w analizie jednoczynnikowej (Tab. 15).

Nie stwierdzono związku żadnego z badanych alleli polimorfizmów mtDNA z zachorowaniem na EOAD ( $p > 0,050$ ).

➤ Podsumowując, wykazano, że allel m.9055A (definiujący haplogrupę K) jest niezależnym czynnikiem zmniejszającym ryzyko zachorowania na LOAD w całej grupie. Natomiast m.13368A (definiujący haplogrupę T) jest czynnikiem protekcyjnym tylko w grupie kobiet.

#### 4.2.3 Analiza klasterów haplogrup mitochondrialnych

##### 4.2.3.1 Klaster HV zwiększa ryzyko LOAD

Określono częstość występowania filogenetycznie pokrewnych haplogrup, pogrupowanych w klastery: HV, JT, KU oraz IWX w badanych grupach. Analiza jednoczynnikowa wskazała na istotny statystycznie związek pomiędzy klasterem HV a ryzykiem zachorowania na LOAD w całej grupie badanej ( $p = 0,022$ ) oraz osobno w grupie kobiet ( $p = 0,039$ ; Tab. 17).

**Tabela 17.** Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy (test  $\chi^2$  lub dwustronny dokładny test Fishera) dla klasterów haplogrup w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

Klaster	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
HV	<b>0,022</b>	1,41	1,05-1,88	<b>0,039</b>	1,45	1,02-2,06	0,316	1,31	0,77-2,22
IWX	0,433	1,31	0,67-2,57	0,587	1,24	0,57-2,74	0,498	1,60	0,41-6,18
KU	0,268	0,82	0,58-1,16	0,744	0,93	0,62-1,41	0,121	0,60	0,31-1,14
JT	0,063	0,70	0,49-1,02	<b>0,017</b>	0,56	0,35-0,90	0,833	0,93	0,50-1,74

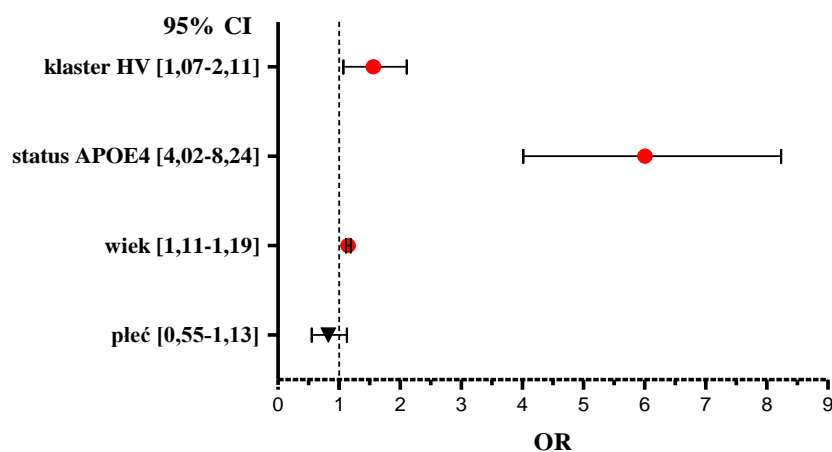
Wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej, uwzględniająca takie zmienne, jak płeć, wiek, status *APOE4* oraz klaster HV, potwierdziła zaobserwowany w analizie jednoczynnikowej udział klastera HV w podwyższaniu ryzyka zachorowania na LOAD ( $p = 0,018$ ; Tab. 18). Związek ten jest znamienny

statystycznie także osobno w grupie kobiet ( $p=0,043$ ). U mężczyzn wspomniana zależność występuje jedynie w postaci trendu (Tab. 17, 18).

**Tabela 18.** Zestawienie wyników wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej ryzyka LOAD, w której poza przynależnością do odpowiedniego klastera haplogrup uwzględniono jako zmienne niezależne także wiek zachorowania/badania (w przypadku osób z grupy kontrolnej), nosicielstwo allelu *APOE4* oraz płeć badanych.

Klaster	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
HV	0,018	1,51	1,07-2,11	0,043	1,52	1,01-2,28	0,227	1,45	0,79-2,67
IWX	0,393	1,38	0,66-2,92	0,496	1,35	0,57-3,23	0,607	1,46	0,34-6,29
KU	0,155	0,74	0,50-1,12	0,696	0,91	0,56-1,47	0,046	0,46	0,22-0,99
JT	0,099	0,70	0,46-1,07	0,025	0,54	0,32-0,93	0,752	1,12	0,55-2,31

Na Ryc. 17 przedstawiono klaster HV na tle innych zmiennych włączonych do modelu wieloczynnikowej regresji logistycznej.

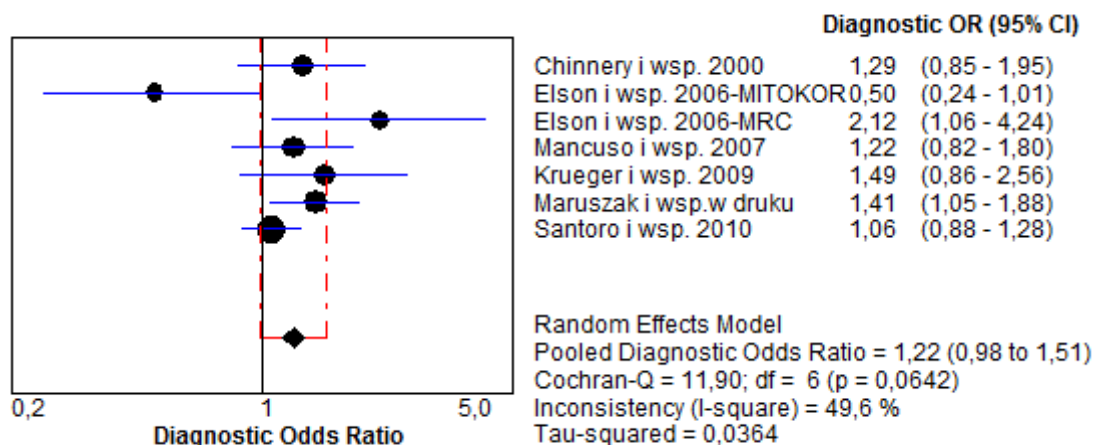


**Ryc. 17.** Wyniki analizy wieloczynnikowej regresji logistycznej uwzględniającej zmienne: płeć, wiek, status *APOE4* oraz nosicielstwo klastera HV.

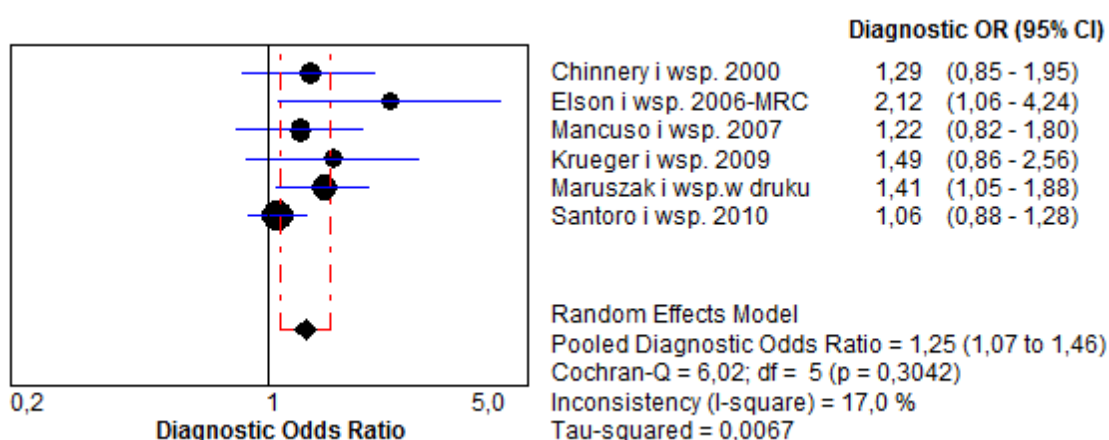
Metaanaliza dotycząca udziału klastera HV w zachorowaniu na LOAD, obejmująca sześć opublikowanych badań oraz badania opisywane w niniejszej rozprawie, nie wykazała istotnej zależności pomiędzy nosicielstwem klastera HV z ryzykiem LOAD (Ryc. 18A).

Jednak jeżeli z modelu usunie się skrajnie odbiegające od pozostałych badań wyniki uzyskane przez Elson i wsp. (2006) dla grupy MITOKOR (dawcy mózgow z Stanów Zjednoczonych; grupa MRC – dawcy z Wielkiej Brytanii), heterogeniczność badanej próby zmniejsza się (Q-test Cochran'a) i metaanaliza tych badań (łącznie 1950 chorych z AD vs 1627 osób z grupy kontrolnej) stwierdza istotną statystycznie asocjację pomiędzy nosicielstwem klastera HV a zachorowaniem na LOAD (OR=1,25, 95% CI 1,07-1,46; Ryc. 18B).

A)



B)



**Ryc. 18.** Wynik metaanalizy związku klastera HV z zachorowaniem na chorobę Alzheimera w A) siedmiu i B) sześciu badaniach, włącznie z opisywanym w niniejszej rozprawie (Maruszak i wsp. w druku). Rycina B pokazuje wynik metaanalizy po wykluczeniu skrajnie odbiegającego wyniku, uzyskanego przez Elson i wsp. (2006) w grupie MITOKOR. Wykresy typu *forest plot* A) i B) przedstawiają wartość ilorazu szans (*Diagnostic OR*) oraz przedział ufności (95% CI) każdego z uwzględnionych w metaanalizie badań. Ich autorzy zostali podani w prawej części ryciny. Podsumowanie wszystkich uwzględnionych w metaanalizie badań zostało oznaczone symbolem diamentu (♦). Wartość Q-testu Cochran'a oraz parametru *I-square* obrazuje poziom heterogeniczności próby, natomiast parametr *Tau-square* opisuje wariancję między badaniami. Wartości te na Ryc. 18B wskazują na niską heterogeniczność i niski poziom wariancji między badaniami. Wyeliminowanie z metaanalizy wyniku uzyskanego przez Elson i wsp. (2006) w grupie MITOKOR zmniejszyło heterogeniczność pozostałych badań i wariancję między nimi.

#### 4.2.3.2 Klaster TJ obniża ryzyko LOAD w grupie kobiet, a klaster KU – w grupie mężczyzn

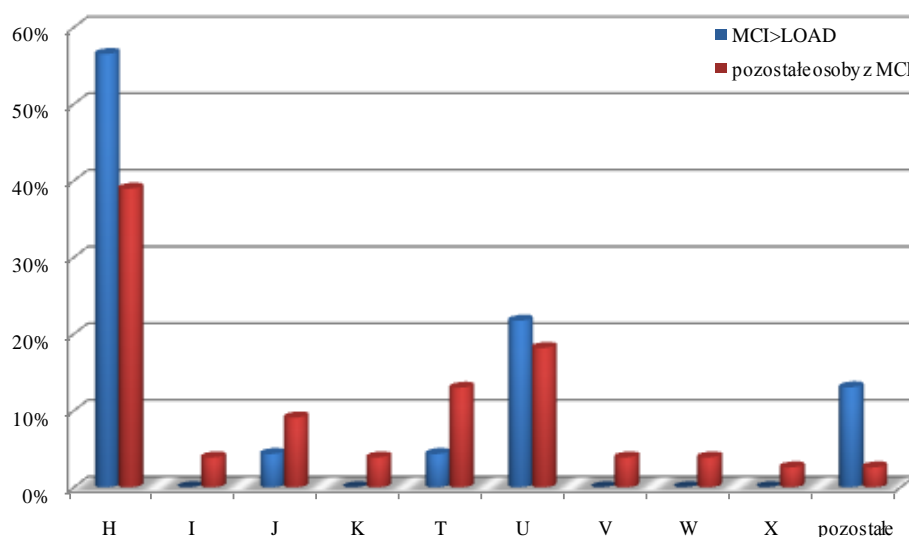
Poza potwierdzeniem zaobserwowanego w mniejszej grupie badanej (Maruszak i wsp., 2009) związku klastera HV z podwyższonym ryzykiem zachorowania na LOAD, stwierdzono, że klaster TJ w grupie kobiet (p=0,025), a klaster KU w grupie mężczyzn (p=0,046) stanowią czynniki protekcyjne, specyficzne dla płci badanych (Tabele 17, 18).

#### 4.2.3.3 Brak związku częstości klasterów haplogrup mitochondrialnych z ryzykiem EOAD

Nie stwierdzono związku klastera HV z ryzykiem EOAD ( $p=0,283$ ,  $OR=0,70$ , 95% CI 0,38-1,31). Jednoczynnikowa analiza częstości klasterów haplogrup w grupie EOAD w porównaniu z grupą kontrolną nie wykazała związku żadnego z nich z ryzykiem EOAD ( $p>0,05$ , dwustronny dokładny test Fishera).

#### 4.2.3.4 Związek haplogrup mitochondrialnych oraz ich klasterów z konwersją łagodnych zaburzeń poznawczych do LOAD

Dodatkową grupę do zbadania roli haplogrupy H i klastera HV w LOAD stanowiły osoby z rozpoznaniem łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI), a szczególnie te, które z biegiem lat rozwinęły LOAD. Każdego roku u 15% osób ze zdiagnozowanymi MCI dochodzi do konwersji do pełnoobjawowej AD (Blennow i Hampel, 2003), stąd interesujące wydało się sprawdzenie występowania zmian sekwencji mtDNA, które mogłyby być charakterystyczne dla tych chorych.

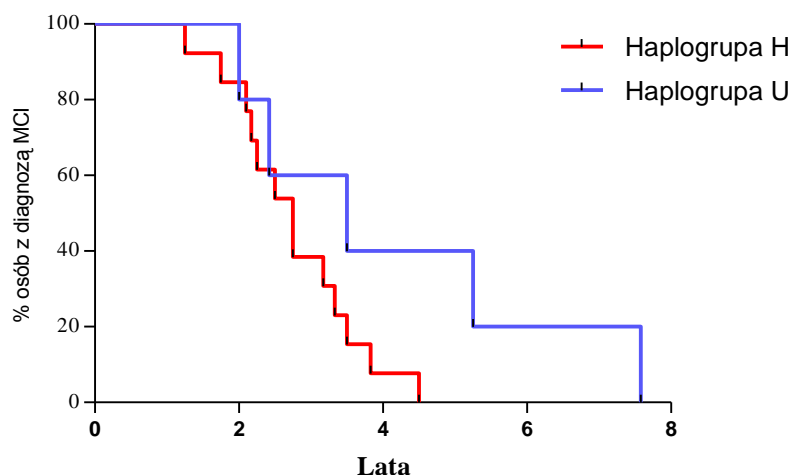


**Ryc. 19.** Częstości mitochondrialnych haplogrup u osób z diagnozą łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI), które rozwinęły LOAD (MCI>LOAD) w porównaniu z tymi, którzy pozostają nadal w stadium MCI.

Wyniki analizy częstości haplogrup mitochondrialnych u osób z diagnozą MCI, które rozwinęły LOAD, w porównaniu z osobami, które pozostały w stadium MCI przedstawiono na Ryc. 19. Najczęstszą haplogrupą u tych, którzy rozwinęli LOAD ( $N=23$ ), jest H (56,5%). Jednak częstość tej haplogrupy ( $p=0,239$ ,  $OR=1,85$ , 95% CI 0,73-4,67) ani pozostałych haplogrup w grupie osób, które rozwinęły LOAD w porównaniu z pozostałymi z MCI, nie jest istotnie różna ( $p>0,05$ ), również po stratyfikacji grupy badanej ze względu na płeć. Podobnie, związek klastera HV z ryzykiem rozwoju LOAD w grupie MCI ma jedynie wartość trendu statystycznego ( $p=0,064$ ,  $OR=2,5$ , 95% CI 0,95-6,59).

Wykonano analizę wieku, w jakim nastąpiła konwersja z MCI do LOAD u nosicieli poszczególnych haplogrup. Uzyskano, że nosiciele haplogrupy U rozwijają LOAD w późniejszym wieku niż nosiciele H (test Manna-Whitneya,  $p=0,023$ ,  $80,4\pm 1,81$  lata vs  $71,9\pm 2,40$ ).

Porównanie długości okresu pomiędzy rozpoznaniem MCI a konwersją do LOAD wskazało na brak znaczących różnic pomiędzy nosicielami haplogrupy H i U [ $p=0,112$ , test Log-rank (Mantel-Cox), Ryc. 20].



**Ryc. 20. Porównanie długości okresu, jaki upłynął od postawienia diagnozy łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI) do rozwinięcia LOAD u nosicieli haplogrupy H i U.**

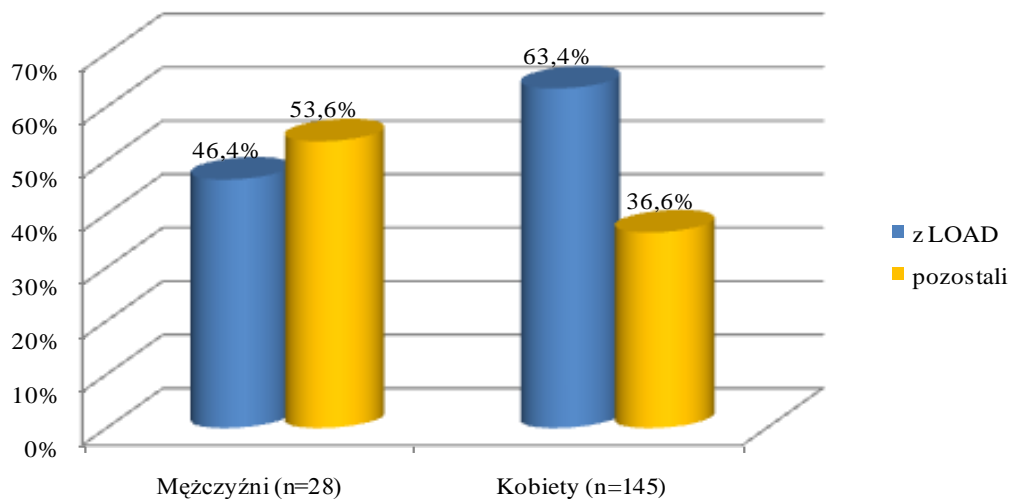
➤ Podsumowując, nie wykazano istotnego statystycznie związku haplogrup mitochondrialnych z ryzykiem konwersji z MCI do LOAD. Uzyskane wyniki wskazują, że haplogrupa H w badanej grupie MCI wiąże się z wcześniejszym wystąpieniem objawów LOAD w porównaniu z haplogrupą U ( $p=0,023$ ).

#### 4.2.4 Późnoobjawowa choroba Alzheimera w grupie stulatków

Dodatkową grupę porównawczą stanowiło 173. stulatków (145 kobiet, 28 mężczyzn) z populacji polskiej. We wspomnianej grupie u 105 osób (92 kobiety, 13 mężczyzn) rozpoznano klinicznie LOAD, u 13 osób rozpoznano MCI, u 9 otępienie naczyniopochodne. W grupie stulatków mężczyźni stanowią mniejszość (Ryc. 21). Jednak różnica pomiędzy liczbą kobiet i mężczyzn w badanej grupie stulatków dotkniętych LOAD jest nieistotna statystycznie ( $p=0,140$ ).

Zarówno u kobiet i mężczyzn z grupy stulatków z rozpoznaniem LOAD najczęstszą haplogrupą jest H (kobiety 45,7%, mężczyźni 38,5%). Analiza związku haplogrup z zachorowaniem na LOAD przeprowadzona w grupie stulatków nie wykazała związku klastra HV ( $p=0,543$ , OR=1,15, 95% CI 0,73-1,80) i haplogrupy H ( $p=0,548$ , OR=1,15, 95% CI 0,73-1,80) z ryzykiem LOAD. Ponadto, 5,7% ( $n=6$ ) stulatków z rozpoznaniem LOAD posiada przynajmniej jeden allel *APOE4* ( $p=0,001$ , OR=0,24, 95% CI 0,01-0,57), podczas gdy wśród stulatków bez LOAD odsetek osób z *APOE4* wynosi 4,41%.

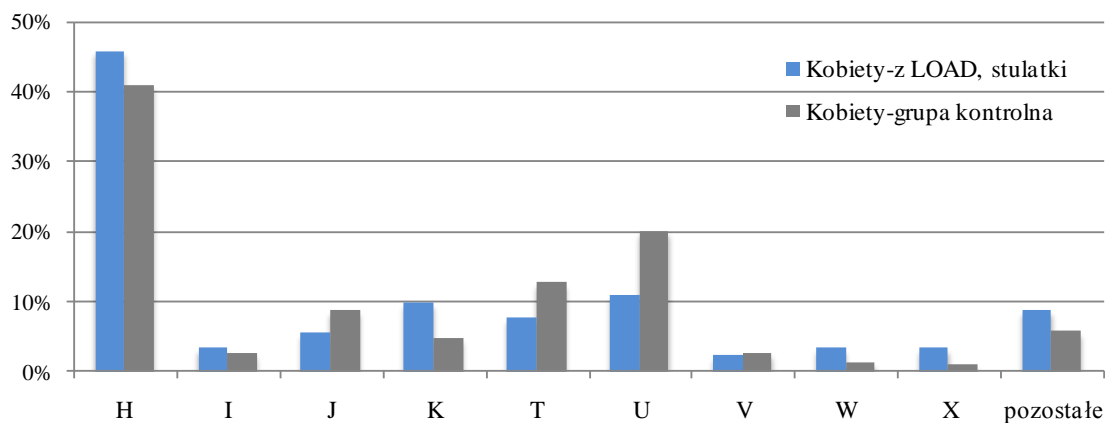




**Ryc. 21. Częstość występowania LOAD u stulatków obu płci.**

Na Rycinie 22 przedstawiono częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie kobiet-stuletek z rozpoznaniem LOAD w porównaniu z kobietami z grupy kontrolnej.

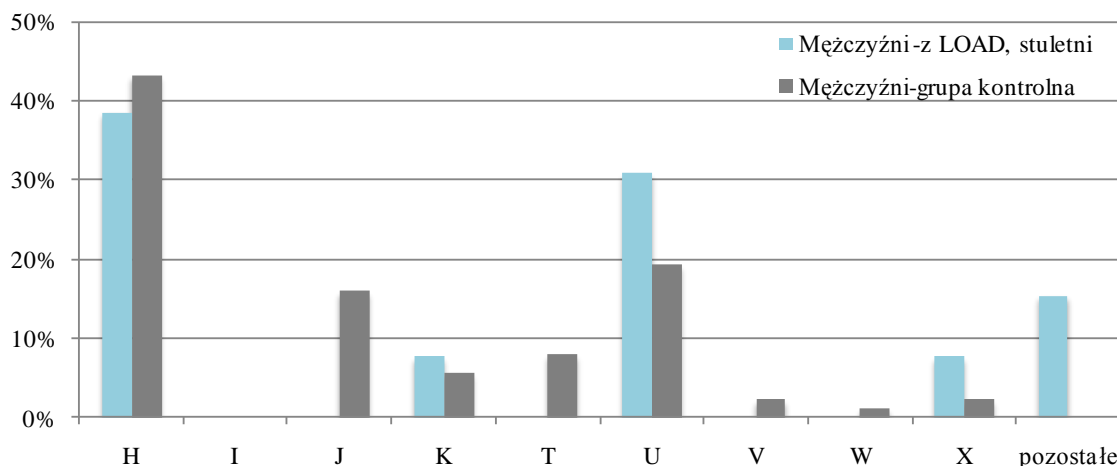
Haplogrupa U związana jest na granicy istotności statystycznej z dwukrotnie niższym ryzykiem zachorowania na LOAD u stuletek ( $p=0,054$ ,  $OR=0,49$ ,  $95\% CI 0,23-1,01$ ). W grupie kobiet nie stwierdzono związku haplogrupy H ani T z ryzykiem LOAD ( $p>0,05$ ).



**Ryc. 22. Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stuletnich kobiet chorych na LOAD oraz u kobiet z grupy kontrolnej.**

W mniej licznej grupie mężczyzn-stulatków stwierdzono obecność tylko niektórych haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej - H, K, U, X (Ryc. 23).



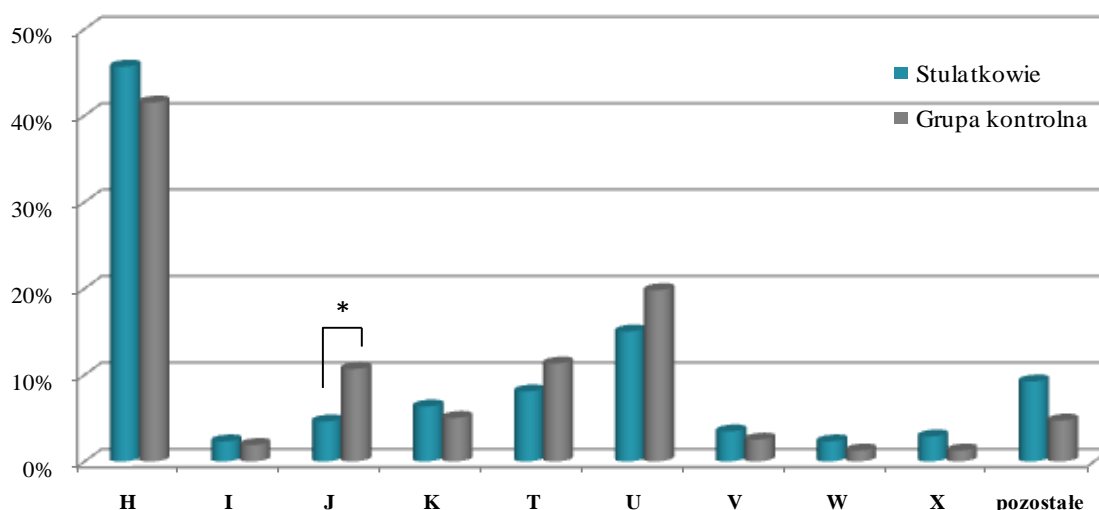


**Ryc. 23.** Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stuletnich mężczyzn z LOAD oraz u mężczyzn z grupy kontrolnej.

Nie stwierdzono związku żadnej z analizowanych haplogrup z modyfikowaniem ryzyka zachorowania na LOAD u mężczyzn-stulatków. Ponadto, zarówno w grupie kobiet, jak i w grupie mężczyzn nie stwierdzono asocjacji żadnego z definiujących haplogrupy polimorfizmów regionu kodującego mtDNA z ryzykiem LOAD ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.5 Haplogrupa J czynnikiem niesprzyjającym długowieczności

Poza analizą wpływu haplogrup mitochondrialnych na ryzyko LOAD, zbadano wpływ haplogrup na długowieczność. Analiza jednoczynnikowa, z zastosowaniem dwustronnego dokładnego testu Fishera wykazała, że haplogrupa J jest istotnie rzadsza wśród stulatków ( $p = 0,027$ , Ryc. 24).



**Ryc. 24.** Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stulatków w porównaniu z grupą kontrolną; \* $p < 0,050$ .

Zależność tę potwierdziła także wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej, uwzględniająca poza badaną haplogrupą czynniki związane z długowiecznością - płeć oraz status *APOE4* ( $p = 0,043$ ,

---

OR=0,43, 95% CI 0,19-0,97). Ponadto, przynależność do klastera TJ zmniejsza ok. dwukrotnie prawdopodobieństwo zostania stulatkiem lub stulatką (OR=0,52, 95% CI 0,31-0,87,  $p=0,013$ ), również jeżeli w modelu uwzględną się płeć badanych czy status *APOE4* (OR=0,53, 95% CI 0,31-0,90,  $p=0,019$ ).

➤ Nie stwierdzono związku pomiędzy zachorowaniem na LOAD w grupie stulatków a rodzajem haplogrupy mitochondrialnej. Wykazano, że haplogrupa J zmniejsza prawdopodobieństwo osiągnięcia długowieczności.

#### 4.2.6 Analiza podhaplogrup i ich podtypów

W zamieszczonej w Suplemencie Tabeli S12 przedstawiono częstości podhaplogrup i ich podtypów w grupie chorych z EOAD, LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Podhaplogrupy i ich podtypy określono na podstawie polimorfizmów regionu kontrolnego (RK) mtDNA oraz – w przypadku podhaplogrup i podtypów haplogrupy H - na podstawie polimorfizmów regionu kodującego mtDNA. Każda z haplogrup dzieli się przynajmniej na kilka podhaplogrup. Najwięcej podhaplogrup stwierdzono w haplogrupach H i U, które jednocześnie stanowią najczęstsze haplogrupy u wszystkich badanych.

Wśród badanych podtypów jedynie H1\*, H1C, oraz U5a1 mają częstość > 4% (Tab. S12). Podhaplogrupa U5a1 jest powiązana ze zmniejszonym ryzykiem LOAD, zarówno w analizie jednoczynnikowej ( $p=0,018$ , OR=0,41, 95% CI 0,20-0,85), jak i w modelu regresji logistycznej obejmującym inne czynniki ryzyka LOAD (status *APOE4*, wiek, płeć), gdzie jest związana z ok. dwukrotnie niższym ryzykiem LOAD ( $p=0,043$ , OR=0,41, 95% CI 0,18-0,97).

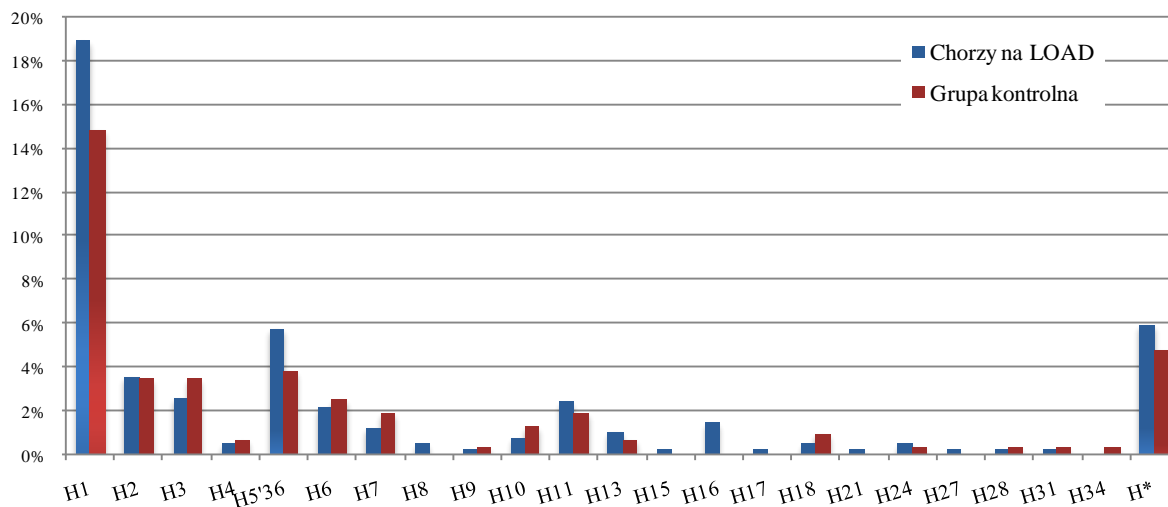
Ponadto, wśród przedstawionych w Tab. S12 podhaplogrup i ich podtypów o niższej częstości występowania, w analizie jednoczynnikowej podhaplogrupa U2 jest istotnie statystycznie związana z ryzykiem LOAD ( $p=0,045$ , OR 3,60, 95% CI 1,03-12,6). Ponadto, podhaplogrupę U3 stwierdzono wyłącznie w grupie LOAD ( $p=0,022$ , OR 11,5, 95% CI 0,65-202,2). Jednak wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej, uwzględniająca status *APOE4*, wiek, płeć oraz U2 lub U3, nie potwierdziła związku obu podhaplogrup z ryzykiem LOAD (odpowiednio  $p=0,125$ ,  $p=0,999$ ).

##### 4.2.6.1 Analiza częstości podhaplogrup i podtypów haplogrupy H

Ponieważ przedstawione wyżej wyniki wskazują na rolę haplogrupy H oraz klastera HV jako czynników ryzyka LOAD, następnie przeprowadzono analizę częstości podhaplogrup i podtypów haplogrupy H, aby sprawdzić, czy któraś/któryś z nich odpowiada za zidentyfikowaną asocjację haplogrupy H z ryzykiem LOAD.

Część z 39. opisanych podhaplogrup i podtypów H (van Oven i Kayser, 2009) można określić na podstawie zmienności RK mtDNA, jednak dla większości z nich należy wykonać genotypowanie polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA. Najpierw określano obecność podhaplogrup o wysokiej częstości występowania (H1, H2, H3, H5), a następnie identyfikowano rzadkie podhaplogrupy, zaczynając analizę od zmian niesynonimicznych. Osoby, dla których nie udało się

ustalić podhaplogrupy H zostały określone jako należące do pozostałych podhaplogrup H (w Tab. S12 i na Ryc. 25 zostały oznaczone jako H<sup>\*</sup>). Wyniki zostały zebrane na Ryc. 25.



**Ryc. 25. Zestawienie częstości (%) podhaplogrup H, zaobserwowanych w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej. Podhaplogrupa H5 została określona na rycinie jako H5'36 wg nazewnictwa bazy danych Phylotree.org.**

Najczęstszą podhaplogrupą w grupie chorych na LOAD jest H1 (19%), drugą co do częstości jest natomiast H5'36 (5,7%). Częstości pozostałych podhaplogrup i badanych podtypów nie przekroczyły wartości 4% zarówno w grupie chorych na LOAD, jak i w grupie kontrolnej (Tab. S12, Ryc. 25). Spośród badanych podhaplogrup, H16 wystąpiła jedynie w grupie LOAD. W analizie jednoczynnikowej z wykorzystaniem dwustronnego dokładnego testu Fishera H16 okazała się istotnie powiązana z ryzykiem LOAD ( $p=0,040$ ). Poza podhaplogrupą H16 nie stwierdzono różnic w częstości pozostałych podhaplogrup H pomiędzy grupą chorych na LOAD a grupą kontrolną ( $p>0,050$ ).

#### 4.2.6.1.1 Interakcja podhaplogrupy H5 i APOE4

Chociaż nie wykazano różnic w częstości występowania podhaplogrupy H5 u chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną, analiza regresji logistycznej (uwzględniająca zmienne: podhaplogrupa H5, status *APOE4*, płeć, wiek, interakcja status *APOE4* x podhaplogrupa H5) wykazała, że interakcja podhaplogrupy H5 z nosicielstwem allelu *APOE4* ma istotnie silniejszy wpływ na zachorowanie na LOAD ( $p=0,009$ ,  $OR=33,13$ ) w porównaniu z samym wpływem nosicielstwa przynajmniej jednego allelu *APOE4* ( $OR=5,12$ ).

Analiza synergii pomiędzy statusem *APOE4+* a podhaplogrupą H5 wykazała silną relację synergistyczną między tymi zmiennymi ( $SF=24,34$ ,  $p=0,013$ ). Spośród 23. osób z LOAD i podhaplogrupą H5, 21. posiada przynajmniej jeden allel *APOE4* (Tab. 19). W grupie kontrolnej proporcja nosicieli podhaplogrupy H5 o statusie *APOE4+* przedstawia się odwrotnie – jedna osoba z grupy kontrolnej posiada haplogrupę H5 i genotyp *APOE3/4*, pozostałe osoby z podhaplogrupą H5 mają status *APOE4-* (Tab. 19).

**Tabela 19.** Analiza synergii pomiędzy podhaplogrupą H5 a statusem *APOE4*. Iloraz szans dla osób nie posiadających H5 i allelu *APOE4* był traktowany jako referencyjny dla pozostałych porównań (OR=1).

Podhaplogrupa H5	<i>APOE4</i>	Grupa kontrolna, n	Chorzy z LOAD, n	OR
-	-	243	179	1,0
+	-	11	2	0,25
-	+	63	220	4,74
+	+	1	21	28,51

➤ Podsumowując, interakcja podhaplogrupy H5 z *APOE4* sprzyja wyższemu ryzyku zachorowania na LOAD (OR=33,13) niż pojedyncze oddziaływanie *APOE4*.

#### 4.2.6.2 Haplogrupy i podhaplogrupy związane z fenotypem częściowego rozprzęgnięcia fosforylacji oksydacyjnej obniżają ryzyko LOAD

W celu weryfikacji hipotezy o roli haplogrup związanych z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej w zachorowaniu na LOAD (Wallace i wsp., 2003), pogrupowano haplogrupy i podhaplogrupy niosące zmiany w *CYTB* oraz *ATP6* (U4, U5a1, K, J1c, J2, T) według narastającej liczby polimorfizmów w tych genach. Opisano powyżej związek podhaplogrupy U5a1 w całej grupie badanej oraz klastera TJ w grupie kobiet z obniżonym ryzykiem LOAD. Pozostałe haplogrupy i podhaplogrupy związane z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej mają niską częstość, stąd rozpatrując je osobno można nie uchwycić ich znaczenia dla zachorowania na LOAD. Dlatego postanowiono zbadać ich wpływ na ryzyko zachorowania na LOAD poprzez stopniowe dodawanie ich do siebie.

Agregując zatem kolejno podhaplogrupy i haplogrupy – najpierw z klastera KU, następnie dodając haplogrupę J (sprawdzając oddzielnie także jej dwie podhaplogrupy J1c, J2), i w końcu haplogrupę T, uzyskano, że w całej grupie badanej zagregowane haplogrupy i podhaplogrupy związane z rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej są istotnie statystycznie związane z mniejszym ryzykiem zachorowania na LOAD (Tab. 20), także jeśli włączy się je do wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (Tab. 21).

**Tabela 20.** Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy częstości haplogrup i podhaplogrup związanych z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej w grupie chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną oraz po podzieleniu badanych ze względu na płeć (test  $\chi^2$ , dwustronny dokładny test Fishera).

Analiza jednoczynnikowa	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
U4+U5a1+K	0,58	0,38-0,89	0,013	0,70	0,42-1,15	0,161	0,38	0,17-0,88	0,024
U4+U5a1+K+J	0,58	0,41-0,83	0,002	0,72	0,47-1,09	0,124	0,34	0,20-0,69	0,002
U4+U5a1+K+J1c	0,59	0,41-0,85	0,005	0,77	0,50-1,20	0,246	0,32	0,16-0,64	0,001
U4+U5a1+K+J1c+J2	0,61	0,43-0,88	0,008	0,75	0,49-1,16	0,195	0,39	0,20-0,75	0,005
U4+U5a1+K+J1c+J2+T	0,62	0,45-0,84	0,003	0,58	0,39-0,85	0,005	0,68	0,39-1,19	0,179
U4+U5a1+K+J+T	0,58	0,42-0,79	0,0006	0,56	0,38-0,82	0,003	0,62	0,36-1,07	0,087
U+K+J+T	0,69	0,51-0,92	0,012	0,68	0,48-0,97	0,035	0,68	0,40-1,15	0,152

Uzyskane wyniki analizy wpływu zagregowanych podhaplogrup i haplogrup w grupie kobiet wskazują na wyraźny wpływ haplogrupy T na ryzyko LOAD. W grupie mężczyzn stwierdzono, że

główną rolę w zmniejszaniu ryzyka zachorowania na LOAD zarówno w analizie jedno- jak i wieloczynnikowej odgrywają zagregowane haplogrupy i podhaplogrupy U4, U5a1 oraz K.

**Tabela 21.** Zestawienie wyników wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej, która obejmowała zmienne: płeć, wiek zachorowania, nosicielstwo allelu *APOE4* oraz zagregowane haplogrupy i podhaplogrupy o postulowanej funkcji w częściowym rozprzęgnięciu fosforylacji oksydacyjnej.

Analiza wieloczynnikowa	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>
U4+U5a1+K	0,58	0,35-0,96	<b>0,036</b>	0,73	0,40-1,33	0,303	0,34	0,13-0,87	<b>0,025</b>
U4+U5a1+K+J	0,64	0,43-0,96	<b>0,030</b>	0,47	0,47-1,25	0,287	0,44	0,22-0,91	<b>0,026</b>
U4+U5a1+K+J1c	0,64	0,42-0,99	<b>0,043</b>	0,79	0,47-1,32	0,367	0,41	0,19-0,89	<b>0,025</b>
U4+U5a1+K+J1c+J2	0,69	0,46-1,05	0,085	0,81	0,49-1,33	0,395	0,50	0,24-1,07	0,074
U4+U5a1+K+J1c+J2+T	0,63	0,44-0,91	<b>0,013</b>	0,58	0,37-0,90	<b>0,015</b>	0,77	0,40-1,47	0,427
U4+U5a1+K+J+T	0,59	0,41-0,84	<b>0,004</b>	0,56	0,36-0,86	<b>0,009</b>	0,67	0,35-1,25	0,208
U+K+J+T	0,64	0,46-0,91	<b>0,012</b>	0,64	0,42-0,97	<b>0,037</b>	0,66	0,36-1,21	0,182

➤ Poprzez stopniowe grupowanie podhaplogrup i haplogrup U4, U5a1, K, J1c, J2, T zweryfikowano pozytywnie hipotezę Wallace i wsp. (2003) o ich protekcyjnym wpływie na zapadalność na choroby neurozwyrodnieniowe – w tym przypadku na LOAD. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na protekcyjną rolę haplogrup i podhaplogrup związanych z rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej, także jeżeli uwzględni się obecność innych czynników wpływających na ryzyko zachorowania na LOAD.

#### 4.2.7 Analiza zmienności regionu kontrolnego mtDNA w grupie AD w porównaniu z grupą kontrolną

W RK mtDNA badanych stwierdzono 244 różnych homoplazmatycznych polimorfizmów o charakterze jednonukleotydowych podstawień, z których 90 występowało w grupie EOAD, 203 w grupie LOAD, oraz 175 w grupie kontrolnej. Wszystkie zidentyfikowane zmiany zebrano w Tabeli S14 (Suplement). W grupie stulatków zidentyfikowano 131 różnych jednonukleotydowych podstawień, jednak z uwagi na to, że charakterystyka tej grupy nie jest przedmiotem tej pracy, nie zostaną one szczegółowo omówione.

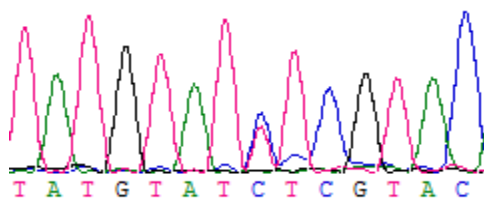
Ponadto, u osób z LOAD oraz w grupie kontrolnej poza jednonukleotydowymi podstawieniami stwierdzono obecność pięciu różnych delecji (w tym trzy jednonukleotydowe, jedna dwunukleotydowa oraz jedna trzynukleotydowa) oraz insercji w ośmiu różnych pozycjach nukleotydowych (m.42, m.309, m.310, m.315, m.455, m.490, m.573). Przedstawiono je w Tabeli 22.

**Tabela 22.** Porównanie częstości występowania insercji i delecji w regionie kontrolnym mtDNA w grupie chorych na LOAD, EOAD i w grupie kontrolnej.

	Grupa LOAD, n	Grupa kontrolna, n	Grupa EOAD, n
<i>Delecje</i>			
<b>m.249D</b>	2	1	1
<b>m.307-309D</b>	0	1	0
<b>m.498D</b>	5	0	0
<b>m.16257D</b>	1	0	0
<b>m.523-524D</b>	43	28	9
<i>Insercje</i>			
<b>m.42.1G</b>	0	1	0
<b>m.309.1C</b>	231	173	24
<b>m.309.2C</b>	58	35	2
<b>m.309.3C</b>	0	1	0
<b>m.310.1T</b>	2	1	0
<b>m.315.1C</b>	413	308	46
<b>m.455.1T</b>	3	3	1
<b>m.523.1C m.523.2A</b>	37	33	7
<b>m.573nC</b>	18	9	1

D - delecja

We wszystkich badanych grupach zaobserwowano także zmiany heteroplazmatyczne (Tab. 23). Przykład heteroplazmii punktowej pokazano na Ryc. 26.



**Ryc. 26. Heteroplazmia w pozycji m.16093.**

Pozycje nukleotydowe: m.204, m.152, m.195, m.16093, m.16189 oraz m.16519 są znanymi miejscami typu *hotspot* w RK mtDNA (Santos i wsp., 2008; Irwin i wsp., 2009). W grupie LOAD stwierdzono 12 przypadków heteroplazmii punktowej, dotyczącej ośmiu pozycji w RK mtDNA. Częstość występowania heteroplazmii punktowej w grupie LOAD wynosi 2,8%. W grupie kontrolnej heteroplazmię odnotowano w siedmiu pozycjach. Częstość heteroplazmii punktowej w grupie kontrolnej wynosi 2,2%. W trzech pozycjach heteroplazmia występuje zarówno w grupie LOAD, jak i w grupie kontrolnej (Tab. 23).

Pomiędzy badanymi grupami nie stwierdzono różnic w częstości heteroplazmii długości (dotyczącej traktów homopolimerycznych w RK między nukleotydami 16184-16195, 303-315, 568-573 oraz traktu powtórzeń AC w pozycji 515-523).

W grupie EOAD polimorfizmy wykazujące heteroplazmatyczność alleli są specyficzne wyłącznie dla tej grupy (m.195T/C, m.497C/T, m.16129G/A) i nie stwierdzono ich w grupie LOAD ani w grupie kontrolnej. Częstość występowania heteroplazmii punktowej w grupie EOAD jest wyższa niż w LOAD i w grupie kontrolnej (6,12%), jednak różnica ta nie jest istotna statystycznie ( $p=0,153$ ).

**Tabela 23.** Zestawienie jednonukleotydowych zmian heteroplazmatycznych, zaobserwowanych w regionie kontrolnym u chorych z LOAD, EOAD i w grupie kontrolnej.

Zmiany heteroplazmatyczne	Grupa LOAD, n	Grupa kontrolna, n	Grupa EOAD, n
m.152T/C	3	0	0
m.195T/C	0	0	1
m.204T/C	2	1	0
m.310C/T	1	1	0
m.497C/T	0	0	1
m.499G/A	0	1	0
m.16093C/T	1	0	0
m.16129G/A	0	0	1
m.16183C/A	1	0	0
m.16189C/T	2	0	0
m.16192C/T	1	1	0
m.16193C/T	0	1	0
m.16291C/T	1	0	0
m.16294C/T	0	1	0
m.16301C/T	0	1	0
m.16519T/C	0	0	1

➤ Podsumowując, nie stwierdzono różnic w częstości heteroplazmii długości ani w częstości heteroplazmii punktowej pomiędzy chorymi na LOAD, EOAD i grupą kontrolną.

#### 4.2.7.1 Identyfikacja nowych wariantów mtDNA

Wśród zidentyfikowanych polimorfizmów stwierdzono warianty nieopisane dotąd w bazach danych MITOMAP oraz Human Mitochondrial Genome Database. Przedstawiono je w Tab. 24. Dziewięć z nich występuje wyłącznie w grupie LOAD, trzy w grupie kontrolnej.

**Tabela 24.** Zidentyfikowane nowe warianty w regionie kontrolnym mtDNA, nieopisane w bazach danych (MITOMAP, Human Mitochondrial Genome database, 30.06.2010). Podstawienia nukleotydowe podano względem sekwencji referencyjnej (rCRS) oraz przedstawiono ich usytuowanie w funkcjonalnych fragmentach regionu kontrolnego.

Wariant	Chorzy z LOAD, n	Grupa kontrolna, n	Haplogrupa mtDNA	Płeć	Wiek <sup>a</sup>	Locus	APOE
m.16A>T	1	0	U5a1	K	66	7S DNA	23
m.203G>C	1	0	H2	K	80	HVSII, OH	33
m.211A>G	1	0	J1c	K	79	HVSII, OH	34
m.273C>T	1	0	H6	M	68	OH, TFY, HVSII	34
m.299D	1	0	H6	K	71	CSB2, TFY, HVSII	34
m.16474G>T	1	0	K1c	K	73	--	33
m.16290C>G	1	0	A8	K	76	HVSI, 7S DNA	33
m.16213G>C	1	0	H1c	M	68	HVSI, 7S DNA	44
m.16078A>C	1	0	U3	K	79	HVSI	44
m.490.1C	0	1	J1c	M	65	HVSIII	33
m.42.1G	0	1	H11	K	61	7S DNA	33
m.16179C>G	0	1	J1c	K	79	7S DNA, HVSI	24

<sup>a</sup> wiek (w latach) wystąpienia pierwszych objawów LOAD bądź wiek pobrania krwi – w przypadku osoby z grupy kontrolnej; D- delecja; K- kobieta; M- mężczyzna; HVSI-III- region hiperzmienny I-III; TFY - miejsce wiązania mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego, OH - miejsce początku syntezy nici H; CSB2 (*Conserved sequence block 2*)

W przypadku wariantu m.42.1G w tej samej pozycji nie odnotowano dotychczas innych polimorfizmów bądź mutacji (MITOMAP, Human Mitochondrial Genome Database, 30.06.2010), w

odróżnieniu od pozostałych wariantów, zidentyfikowanych w niniejszym badaniu. Polimorfizm m.16A>T został stwierdzony u jednej osoby z LOAD, wykryto go także w populacji polskiej u chorej z rakiem endometrium (Czarnecka i wsp., 2009). Ponadto, wariant m.273C>T jest obecny w postaci heteroplazmatycznej w mięśni chorego na jedną z chorób mitochondrialnych (Del Bo i wsp., 2003). W grupie EOAD nie stwierdzono żadnych nieopisanych wariantów.

#### 4.2.7.2 Różnice w częstości polimorfizmów w regionie kontrolnym w grupie AD oraz w grupie stulatków w porównaniu z grupą kontrolną

Analiza częstości polimorfizmów w regionie kontrolnym mtDNA wykazała, że frekwencja siedmiu z nich, m.217T>C, m.242C>T, m.497C>T, m.16126T>C, m.16343A>G, m.16129G>C oraz m.16224T>C, istotnie różni się pomiędzy grupą LOAD a grupą kontrolną (Tabela 25).

Zastosowanie wieloczynnikowej regresji logistycznej (uwzględniającej płeć, wiek, status *APOE4* oraz wspomniany polimorfizm) wykazało istotne statystycznie protekcyjne znaczenie alleli m.16224C ( $p=0,028$ ), m.242T ( $p=0,039$ ) oraz m.497T ( $p=0,002$ ) (Tab. 25). Allel m.242T jest jednym z markerów definiujących podhaplogrupę J1b1, podczas gdy m.16224C jest jednym z markerów haplogrupy K, a m.497T – podhaplogrupy K1a.

**Tabela 25.** Zestawienie wyników jedno- i wieloczynnikowej analizy znaczenia polimorfizmów regionu kontrolnego (RK), m.217T>C, m.242C>T, m.497C>T, m.16126T>C, m.16343A>G, m.16129G>C oraz m.16224T>C, w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z wykorzystaniem dwustronnego dokładnego testu Fishera. W wieloczynnikowej analizie regresji logistycznej uwzględniono zmienne płeć, wiek, status *APOE4* oraz badany polimorfizm.

Polimorfizm RK mtDNA	Analiza jednoczynnikowa			Analiza wieloczynnikowa		
	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI
m.217T>C	0,019	5,02	1,26- 20,03	0,079	4,42	0,84-23,19
m.242C>T	0,036	0,25	0,07-0,92	0,039	0,20	0,04-0,92
m.497C>T	0,003	0,21	0,07-0,61	0,002	0,15	0,05-0,50
m.16126T>C	0,049	0,69	0,48 -0,996	0,052	0,66	0,43-1,00
m.16343A>G	0,012	∞	1,80-∞	nd.		
m.16129G>C	0,012	4,77	1,45-15,64	0,129	2,94	0,73-11,82
m.16224T>C	0,024	0,42	0,20- 0,88	0,028	0,38	0,16-0,90

Allel m.16343G w analizie z zastosowaniem dwustronnego testu Fishera okazał się istotnie statystycznie związany z ryzykiem LOAD ( $p=0,012$ ). Żadna z osób z grupy kontrolnej nie była nosicielem tego polimorfizmu, w związku z tym niemożliwe było wykonanie wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej. Allel m.16343G jest markerem haplogrupy U3.

Analiza zmienności RK u stulatków z LOAD wskazała na istotne różnice w częstości polimorfizmów m.16183A>C ( $p=0,005$ , OR=3,07, 95% CI 1,39-6,76) oraz m.16126T>C ( $p=0,025$ , OR=0,48, 95% CI 0,25-0,91) w porównaniu z grupą kontrolną. W analizie regresji logistycznej, uwzględniającej także płeć jako czynnik ryzyka LOAD u stulatków, potwierdzono protekcyjną rolę allelu m.16126C ( $p=0,025$ , 0,48, 95% CI 0,25-0,91) oraz związek m.16183C ( $p=0,002$ , OR=3,57, 95% CI 1,57-8,11) z ryzykiem LOAD w grupie stulatków. Warto zaznaczyć, że w analizie



wieloczynnikowej przeprowadzonej w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną zaobserwowano trend, wskazujący na protekcyjną rolę allelu m.16126C ( $p=0,052$ ). W grupie EOAD nie stwierdzono związku żadnego z polimorfizmów regionu kontrolnego z ryzykiem zachorowania na EOAD ( $p>0,050$ ).

➤ Podsumowując, zidentyfikowano rolę alleli m.16224C ( $p=0,028$ ), m.242T ( $p=0,039$ ) oraz m.497T ( $p=0,002$ ) w zmniejszaniu ryzyka LOAD. Ponadto, allel m.16126C ( $p=0,025$ ) jest związany z niższym ryzykiem LOAD w grupie stulatków, natomiast allel m.16183C ( $p=0,002$ ) z wyższym ryzykiem LOAD w grupie stulatków.

### 4.3 Badanie wpływu zmienności genów jądrowych na ryzyko AD

#### 4.3.1 Analiza roli wybranych dwóch polimorfizmów *TFAM* w AD

##### 4.3.1.1 Polimorfizm rs1937 (c.35G>C, Ser12Thr) *TFAM*

Genotypy i allele polimorfizmu rs1937 *TFAM* w badanych grupach były w równowadze Hardy'ego i Weinberga ( $p>0,1$ ). Nie stwierdzono różnic w częstościach alleli i genotypów polimorfizmu rs1937 dla grup LOAD i EOAD, w porównaniu z grupą kontrolną, także po stratyfikacji badanych ze względu na płeć (Tab. S15, S16, Supplement). Ponadto, nie ma różnic w średniej wartości wieku zachorowania na LOAD ( $p=0,178$ ) i EOAD ( $p=0,333$ ) u nosicieli genotypów rs1937 GG, GC i CC. Następnie stratyfikowano badanych ze względu na status *APOE4* i określono częstość genotypów polimorfizmu rs1937 w podgrupach *APOE4+* i *APOE4-* (Tab. 26).

**Tabela 26.** Częstości genotypów rs1937 u nosicieli allelu *APOE4* (status *APOE4+*) oraz u osób pozbawionych *APOE4+* (status *APOE4-*) w grupie chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

<i>TFAM</i> rs1937 (c.35G>C)	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)
	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>
CC	3 (1,24)	2 (3,13)	5 (2,76)	1 (0,39)
GC	41 (17,01)	18 (28,12)	34 (18,78)	47 (18,50)
GG	197 (81,75)	44 (68,75)	142 (78,46)	206 (81,11)
test $\chi^2$	$\chi^2=5,40$ , $df=2$ , $p=0,067$		$\chi^2=4,40$ , $df=2$ , $p=0,111$	
GG vs. GC+CC	$\chi^2=15,6$ , $df=1$ , $p=0,023$ (OR=2,04, 95% CI 1,09-3,79)		$\chi^2=0,464$ , $df=1$ , $p=0,496$ (OR=0,85, 95% CI 0,53-1,36)	

Stwierdzono, że u osób o statusie *APOE4+* genotyp GG rs1937 jest istotnie statystycznie związany z wyższym ryzykiem LOAD ( $p=0,023$ ). W grupie mężczyzn potwierdzono związek genotypu GG u nosicieli przynajmniej jednego allelu *APOE4* z wyższym ryzykiem zachorowania na LOAD ( $p=0,029$ ), zaobserwowany wcześniej w całej badanej próbie (Tab. 26, 27). W grupie kobiet taka zależność nie osiągała istotności. W grupie osób o statusie *APOE4-* nie stwierdzono związku genotypów rs1937 z ryzykiem zachorowania na LOAD.

**Tabela 27.** Częstość genotypów polimorfizmu rs1937 u chorych na LOAD kobiet i mężczyzn w porównaniu z grupą kontrolną (K), podzielonych ze względu na nosicielstwo allelu *APOE4*.

TFAM rs1937 (c.35G>C)	Kobiety, n(%)				Mężczyźni, n(%)			
	LOAD		K		LOAD		K	
	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>
CC	2 (1,32)	1 (2,27)	5 (4,13)	1 (0,54)	1 (1,11)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
GC	26 (17,22)	11 (25,0)	25 (20,66)	33 (17,74)	15 (16,67)	7 (35,0)	9 (15,0)	14 (20,59)
GG	123 (81,46)	32 (72,73)	91 (75,21)	152 (81,72)	74 (82,22)	12 (60,0)	51 (85,0)	54 (79,41)
test $\chi^2$	$\chi^2=1,61$ , df=2, p=0,446		$\chi^2=5,57$ , df=2, p=0,062		$\chi^2=5,14$ , df=2, p=0,076		$\chi^2=0,67$ , df=1, p=0,411	
GG vs. GC+CC	$\chi^2=1,59$ , df=1, p=0,207 (OR=1,65, 95% CI 0,75-3,59)		$\chi^2=1,89$ , df=1, p=0,170, (OR=0,68, 95% CI 0,39-1,18)		$\chi^2=4,74$ , df=1, p=0,029 (OR=3,08, 95% CI 1,08-8,77)		$\chi^2=0,67$ , df=1, p=0,411 (OR=1,47, 95% CI 0,58-3,69)	

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie interakcji pomiędzy *APOE4* i polimorfizmem rs1937, co postanowiono zweryfikować, stosując analizę synergii oraz regresję logistyczną. W rezultacie zidentyfikowano synergistyczną relację pomiędzy allelem *APOE4* a posiadaniem genotypu GG polimorfizmu rs1937 (SF=2,39, p=0,028). Analiza regresji logistycznej, uwzględniająca czynniki ryzyka LOAD (tj. allel *APOE4*, wiek, płeć, oraz polimorfizm rs1937) także potwierdziła rolę interakcji pomiędzy polimorfizmem rs1937 a *APOE4* w ryzyku LOAD (Tab. 28). Interakcja allelu *APOE4* z polimorfizmem rs1937 na tle pozostałych czynników w modelu, okazała się istotnie statystycznie powiązana z ponad dwukrotnym wzrostem ryzyka LOAD.

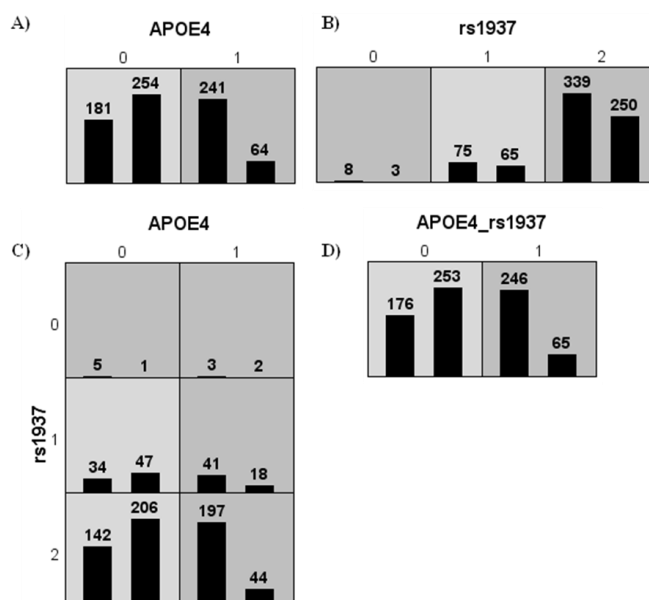
**Tabela 28.** Wyniki analizy regresji logistycznej (uwzględniającej zmienne rs1937, *APOE4*, wiek, płeć oraz interakcję rs1937 z *APOE4*) przeprowadzonej w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej. Przedstawiono wynik analizy regresji logistycznej bez uwzględnienia interakcji polimorfizmu rs1937 z *APOE4* oraz po włączeniu interakcji polimorfizmu rs1937 z *APOE4* do modelu.

Zmienna / interakcja zmiennych	Wszyscy badani			Wszyscy badani		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
rs1937	0,688	1,09	0,72-1,65	0,264	0,75	0,45-1,25
status <i>APOE4</i>	<0,001	5,77	4,03-8,26	0,007	2,69	1,31-5,50
rs1937 x status <i>APOE4</i>	-	-	-	0,018	2,72	1,19-6,20
wiek	<0,001	1,15	1,11-1,18	<0,001	1,15	1,11-1,19
płeć	0,188	0,78	0,55-1,13	0,164	0,77	0,54-1,11

Symbol „x” oznacza interakcję.

Dodatkowo, w analizie regresji logistycznej (obejmującej zmienne: status *APOE4*, płeć, rs1937 oraz status *APOE4* x rs1937) wykazano, że interakcja pomiędzy statusem *APOE4* a rs1937 wywiera silniejszy efekt u osób w wieku  $\leq 72$  lat (p=0,008, OR=4,09, 95% CI 1,44-11,57). W grupie starszych badanych interakcja ta okazała się nieistotna statystycznie (p=0,952).

Analiza wykonana z wykorzystaniem programu MDR, z zastosowaniem filtru ReliefF, wskazała, że najlepszym spośród czterech zaproponowanych modeli jest interakcja *APOE4* x rs1937 (p=0,0013, zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,6857, spójność walidacji krzyżowej 10/10). Model ten okazał się lepszy od zbudowanego z jednej zmiennej – statusu *APOE4*, oraz od pozostałych zaproponowanych przez MDR modeli (Ryc. 27, Tab. 29). Analiza permutacji wykazała, że przewidziany model jest istotny statystycznie (p<0,0010, liczba permutacji: 1000).

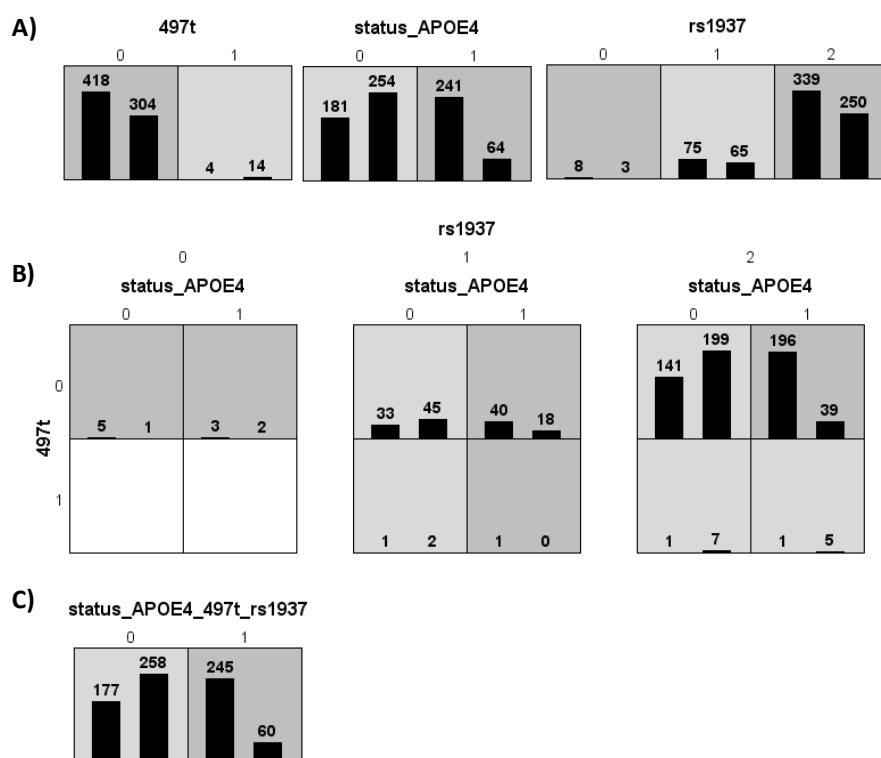


**Ryc. 27.** Graficzne przedstawienie wyników analizy MDR. Kolorem ciemnoszarym MDR zaznacza genotypy o wysokim ryzyku, kolorem jasnoszarym – o niskim ryzyku zachorowania na LOAD. W każdym kwadracie słupki po lewej stronie to liczba chorych z LOAD, słupki po prawej – liczba osób z grupy kontrolnej. A) – wyniki analizy MDR dla nosicielstwa przynajmniej jednego allelu *APOE4* (status *APOE4+* zakodowany jako 1 vs *APOE4-* oznaczony na schemacie cyfrą 0), zrównoważona dokładność dla próby testowanej (*Testing Balanced Accuracy*)=0,685, spójność walidacji krzyżowej (*Cross-validation consistency, CVC*) 10/10,  $p=0,0014$ ; B) – wyniki analizy MDR dla polimorfizmu rs1937 (analiza MDR z zastosowaniem wymuszonego typu wyszukiwania, *Search type: forced*; genotyp rs1937 GG został zakodowany jako 2, GC jako 1, a CC jako 0), zrównoważona dokładność dla próby testowanej =0,513,  $p=0,772$ ; C) – wyniki analizy MDR, typującej jako najlepszy model interakcję pomiędzy statusem *APOE4* i polimorfizmem rs1937 (opis w tekście); D) wyniki analizy MDR z zastosowaniem wymuszonego typu wyszukiwania dla interakcji statusu *APOE4* z rs1937 traktowanej jako jednej zmiennej.

**Tabela 29.** Modele zaproponowane przez program MDR, składające się z 1-4 zmiennych (status *APOE4*, rs1937, Gly482Ser, podhaplogrupa U5b), wraz z ich parametrami.

Modele				Zrównoważona dokładność dla próby testowanej	Spójność walidacji krzyżowej (CVC)	p
Zmienne w modelu						
Status <i>APOE4</i>				0,6849	10/10	0,0014
Status <i>APOE4</i>	rs1937			0,6857	10/10	0,0013
Status <i>APOE4</i>	rs1937	Gly482Ser [PGC-1 $\alpha$ ]		0,6692	7/10	0,0036
Status <i>APOE4</i>	rs1937	Gly482Ser [PGC-1 $\alpha$ ]	Podhaplogrupa U5b	0,6771	10/10	0,0025

Jeżeli do zmiennych uwzględnianych w analizie MDR włączy się polimorfizmy RK mtDNA, z zastosowaniem filtra ReliefF uzyskuje najlepszy model, złożony z kombinacji trzech zmiennych: status *APOE4*, polimorfizm rs1937, polimorfizm m.497C>T ( $p=0,0009$ , zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,6924, spójność walidacji krzyżowej 10/10). Dane dotyczące najlepszego wytypowanego modelu, przedstawione na Ryc. 28 uzupełnia Tabela 30, opisująca pozostałe trzy wytypowane modele.



**Ryc. 28. Graficzne przedstawienie wyników analizy MDR po włączeniu polimorfizmów regionu kontrolnego mtDNA.** Kolorem ciemnoszarym zaznaczono genotypy o wysokim ryzyku, kolorem jasnoszarym – o niskim ryzyku LOAD. W każdym kwadracie słupki po lewej stronie to liczba chorych z LOAD, słupki po prawej – liczba osób z grupy kontrolnej. A) Wyniki analizy MDR z zastosowaniem wymuszonego typu wyszukiwania (*Search type: forced*) dla pojedynczych zmiennych - polimorfizm m.497C>T: zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,5173, p=0,3396; – status *APOE4*: zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,685, p=0,0014; - rs1937: zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,5133, p=0,7718; B) Wyniki analizy MDR, typującej jako najlepszy model interakcję pomiędzy statusem *APOE4*, polimorfizmem m.497C>T oraz rs1937; C) wyniki analizy MDR z zastosowaniem wymuszonego typu wyszukiwania dla interakcji statusu *APOE4* z m.497 oraz rs1937 traktowanej jako jednej zmiennej (zrównoważona dokładność dla próby testowanej=0,6959, p=0,0007). Status *APOE4*+ zakodowano jako 1, *APOE4*- jako 0; Genotyp rs1937 GG zakodowano cyfrą 2, GC jako 1, a CC jako 0; m.497CC zakodowano jako 0, m.497TT jako 1.

**Tabela 30.** Modele zaproponowane przez program MDR, składające się z 1-4 zmiennych (status *APOE4*, rs1937, m.497C>T, podhaplogrupa U5b), wraz z ich parametrami.

Modele				Zrównoważona dokładność dla próby testowanej	Spójność walidacji krzyżowej (CVC)	p
Zmienne w modelu						
Status <i>APOE4</i>				0,6849	10/10	0,0014
Status <i>APOE4</i>	m.497T			0,6817	7/10	0,0016
Status <i>APOE4</i>	m.497T	rs1937		0,6924	10/10	0,0009
Status <i>APOE4</i>	m.497T	rs1937	Podhaplogrupa U5b	0,6892	7/10	0,0011

Na Ryc. 28 widać, że czynnikiem ryzyka LOAD jest interakcja *APOE4* z polimorfizmem rs1937, natomiast polimorfizm m.497C>T (wchodzący w skład podhaplogrupy K1a), jest czynnikiem protekcyjnym. Analiza permutacji wykazała, że przewidziany model jest istotny statystycznie (p<0,0010, liczba permutacji: 1000). Zatem interakcja polimorfizmu rs1937 z *APOE4* zwiększa ryzyko zachorowania na LOAD. Następnie postanowiono sprawdzić, jak na tle tych dwóch zmiennych oddziałuje na ryzyko LOAD wcześniej opisana interakcja pomiędzy podhaplogrupą H5 i statusem

*APOE4*. Przeprowadzono analizę regresji logistycznej, obejmującą czynniki: status *APOE4*, polimorfizm rs1937, podhaplogrupę H5, płeć, wiek oraz interakcje *APOE4* x rs1937, *APOE4* x H5 oraz rs1937 x H5 (Tab. 31). Potwierdzono istotną rolę interakcji *APOE4* x rs1937 ( $p=0,017$ ), *APOE4* x H5 ( $p=0,021$ ), nie stwierdzono natomiast związku pomiędzy posiadaniem haplogrupy H5 a genotypem rs1937.

**Tabela 31.** Wynik wieloczynnikowej regresji logistycznej ryzyka LOAD obejmującej czynniki: status *APOE4*, polimorfizm rs1937, podhaplogrupę H5, płeć, wiek oraz interakcje *APOE4* x rs1937, *APOE4* x H5 oraz rs1937 x podhaplogrupa H5.

Zmienne w modelu	<i>p</i>	OR	95% CI
<i>APOE4</i>	0,020	2,37	1,15-4,88
wiek	<0,001	1,15	1,12-1,19
H5	0,027	0,05	0,03-0,70
<i>APOE4</i> x H5	0,021	26,09	1,65-412,39
rs1937 x <i>APOE4</i>	0,017	2,75	1,19-6,32
rs1937 x H5	0,152	8,19	0,46-145,85
rs1937	0,133	0,67	0,40-1,13
płeć	0,143	0,76	0,53-1,10

Symbol „x” oznaczono badaną interakcję.

➤ Podsumowując, stwierdzono istotną statystycznie interakcję między genotypem GG polimorfizmu rs1937 *TFAM* a *APOE4*. Nie stwierdzono natomiast związku pomiędzy nosicielstwem podhaplogrupy H5 a genotypem GG polimorfizmu rs1937.

#### 4.3.1.2 Polimorfizm rs2306604 (c.441+113A>G) *TFAM*

Częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs2306604 *TFAM* w badanych grupach znajdują się w równowadze Hardy’ego i Weinberga ( $p>0,2$ ). Analiza jednoczynnikowa wykazała istotną statystycznie zależność pomiędzy nosicielstwem genotypu GG polimorfizmu rs2306604 a EOAD ( $p=0,0006$ ) i LOAD ( $p=0,039$ ) (Tab. 32, 33).

Allel G jest związany ze zwiększonym ryzykiem LOAD w całej grupie badanej (OR=1,24), a także w grupie kobiet (OR=1,29; Tab. 32).

**Tabela 32.** Analiza częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs2306604 w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

<i>TFAM</i> rs2306604 c.441+113G>A	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	Kobiety z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna- kobiety, n (%)	Mężczyźni z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna- mężczyźni, n (%)
<i>Genotypy</i>						
GG	75 (17,82)	39 (12,26)	48 (17,64)	31 (13,48)	27 (18,12)	8 (9,09)
AG	205 (48,69)	158 (49,69)	142 (52,21)	111 (48,26)	63 (42,28)	47 (53,41)
AA	141 (33,49)	121 (38,05)	82 (30,15)	88 (38,26)	59 (39,60)	33 (37,5)
test $\chi^2$	$\chi^2=4,72$ , df=2, $p=0,095$		$\chi^2=3,15$ , df=2, $p=0,207$		$\chi^2=4,59$ , df=2, $p=0,101$	
GG vs. AA+AG	$p=0,039$ [OR=1,55, 95% CI 1,02-2,35]		$p=0,201$ [OR=1,38, 95% CI 0,84-2,24]		$p=0,058$ [OR=2,21, 95%CI 0,97- 5,02]	
<i>Allele</i>						
G	355 (42,16)	236 (37,11)	238 (43,75)	173 (37,61)	117 (39,26)	63 (35,79)
A	487 (57,84)	400 (62,89)	306 (56,25)	287 (62,39)	181 (60,74)	113 (64,21)
test $\chi^2$	$p=0,049$ [OR 1,24, 95% CI 1,0-1,52]		$p=0,049$ [OR 1,29, 95% CI 1,002-1,66]		$p=0,452$ [OR 1,16, 95% CI 0,79- 1,70]	

W grupie EOAD allel G rs2306604 jest także związany z ryzykiem choroby ( $p=0,016$ ; Tab. 33). Z uwagi na niewielką liczebność grupy EOAD nie wykonano stratyfikacji ze względu na płeć.

**Tabela 33.** Analiza częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs2306604 w grupie EOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

<i>TFAM</i> , rs2306604 (c.441+113G>A)	EOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)
<b>Genotypy</b>		
GG	16 (33,33)	39 (12,26)
AG	16 (33,33)	158 (49,69)
AA	16 (33,33)	121 (38,05)
Test $\chi^2$ (df=2)	$p=0,0006$	
GG vs. AA+AG	$p=0,001$ (OR=3,58, 95% CI 1,80-7,07)	
<b>Allele</b>		
G	48 (50,0)	236 (37,11)
A	48 (50,0)	400 (62,89)
Test $\chi^2$ (df=1)	$p=0,016$ (OR=1,69, 95% CI 1,10-2,61)	

Wyniki analizy jednoczynnikowej potwierdziła analiza regresji logistycznej, z uwzględnieniem dodatkowych czynników ryzyka LOAD, takich jak wiek, status *APOE4* i płeć. Posiadanie przynajmniej jednego allelu G (genotyp GG, AG) polimorfizmu rs2306604 jest na granicy istotności statystycznej związane ze zwiększonym ryzykiem LOAD ( $p=0,050$ , OR=1,28, 95% CI 1,00-1,64; Tab. 34).

**Tabela 34.** Analiza regresji logistycznej uwzględniająca zmienne: status *APOE4*, wiek, płeć oraz polimorfizm rs2306604 w genie *TFAM* (1) oraz badanie wzajemnej interakcji rs2306604 i nosicielstwa allelu *APOE4* (2).

Zmienna/ Interakcja zmiennych	1			2		
	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI
status <i>APOE4</i>	<0,001	5,80	4,05-8,32	<0,001	6,24	3,62-10,76
wiek	<0,001	1,15	1,11-1,19	<0,001	1,15	1,14-1,19
płeć	0,190	0,78	0,54-1,13	0,190	0,78	0,54-1,13
rs2306604	0,050	1,28	1,00-1,64	0,075	1,33	0,97-1,81
rs2306604 x <i>APOE4</i>	-			0,723	0,91	0,54-1,52

Symbol "x" oznacza interakcję.

U kobiet zależność ta ma postać trendu ( $p=0,060$ , OR=1,33, 95% CI 0,99-1,80), natomiast w podgrupie mężczyzn nie stwierdzono zależności statystycznej ( $p=0,461$ , OR=1,18, 95% CI 0,76-1,85). Nie stwierdzono także interakcji polimorfizmu rs2306604 ze statusem *APOE4* w badanej grupie ( $p=0,723$ ) (Tab. 34).

Następnie przeprowadzono analizę współwystępowania statusu *APOE4* (status *APOE4+* vs status *APOE4-*) i genotypów polimorfizmu rs2306604 (Tab. 35). U osób *APOE4-*, genotyp GG polimorfizmu rs2306604 stanowi czynnik ryzyka LOAD ( $p=0,022$ ).

**Tabela 35.** Częstość genotypów polimorfizmu rs2306604 u osób *APOE4+* i *APOE4-* u chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).

<i>TFAM</i> , rs2306604 (c.441+113G>A)	LOAD, n (%)	K, n (%)	LOAD, n (%)	K, n (%)
	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>
<b>GG</b>	42 (17,43)	12 (18,75)	33 (18,33)	27 (10,63)
<b>GA</b>	120 (49,79)	24 (37,5)	85 (47,22)	134 (52,76)
<b>AA</b>	79 (32,78)	28 (43,75)	62 (34,45)	93 (36,61)
<b>test <math>\chi^2</math>, df=2</b>	$\chi^2=3,40$ , p=0,182		$\chi^2=5,30$ , p=0,071	
<b>GG vs. GA+AA</b>	$\chi^2=0,061$ , df=1, p=0,805, OR=0,91, 95% CI 0,45-1,86		$\chi^2=5,25$ , df=1, p= <b>0,022</b> , OR=1,89, 95% CI 1,09-3,27	
<b>AA vs. GG+GA</b>	$\chi^2=2,67$ , df=1, p=0,102, OR=0,63, 95% CI 0,36-1,10		$\chi^2=0,216$ , df=1, p=0,642, OR=0,91, 95% CI 0,61-1,36	
<b>GA vs. AA+GG</b>	$\chi^2=3,07$ , df=1, p=0,080, OR=1,65, 95% CI 0,94-2,91		$\chi^2=1,29$ , df=1, p=0,256, OR=0,80, 95% CI 0,55-1,17	

Ponadto, nie stwierdzono wpływu genotypów polimorfizmu rs2306604 na wiek zachorowania na późno- (p=0,639) i wczesnoobjawową AD (p=0,761).

➤ Podsumowując, stwierdzono, że genotyp GG polimorfizmu rs2306604 jest związany z wyższym ryzykiem LOAD (p=0,039). Wydaje się jednak, że jego wpływ ujawnia się raczej u osób o statusie *APOE4-* (p=0,022). U chorych z EOAD w porównaniu z grupą kontrolną genotyp GG (p=0,0006) i allel G polimorfizmu rs2306604 (p=0,016) stanowią czynnik ryzyka zachorowania.

#### 4.3.1.3 Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs1937 i rs2306604

Analiza haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs1937 oraz rs2306604 wykazała, że znajdują się one w całkowitej nierównowadze sprzężeń ( $D^2=1$ ). Najczęstszym haplotypem jest  $G_{rs1937}A_{2306604}$ , na granicy istotności statystycznej częstszy w grupie kontrolnej w porównaniu z chorymi na LOAD (p=0,050). W grupie kobiet haplotyp  $G_{rs1937}A_{2306604}$  jest także istotnie częstszy w grupie kontrolnej (p=0,049).

Drugi co do częstości haplotyp,  $G_{rs1937}G_{2306604}$ , jest istotnie statystycznie częstszy w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (p=0,023; Tab. 36).

**Tabela 36.** Zestawienie częstości haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs1937 oraz rs2306604 w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej, oraz po stratyfikacji grup ze względu na płeć.

Haplotypy	Częstość haplotypu (%)	Grupa LOAD (%)	Grupa kontrolna (%)	Test $\chi^2$
<b>Wszyscy badani</b>				
$G_{rs1937}A_{2306604}$	60	57,9	62,9	$\chi^2=3,83$ , p=0,050
$G_{rs1937}G_{2306604}$	29	31,4	25,9	$\chi^2=5,16$ , p= <b>0,023</b>
$C_{rs1937}G_{2306604}$	10,9	10,8	11,2	$\chi^2=0,054$ , p=0,816
<b>Kobiety</b>				
$G_{rs1937}A_{2306604}$	59,1	56,2	62,4	$\chi^2=3,89$ , p= <b>0,049</b>
$G_{rs1937}G_{2306604}$	29,7	31,8	27,2	$\chi^2=2,56$ , p=0,110
$C_{rs1937}G_{2306604}$	11,3	11,9	10,4	$\chi^2=0,57$ , p=0,449
<b>Mężczyźni</b>				
$G_{rs1937}A_{2306604}$	62,1	60,8	64,2	$\chi^2=0,55$ , p=0,459
$G_{rs1937}G_{2306604}$	27,7	30,5	22,7	$\chi^2=3,38$ , p=0,066
$C_{rs1937}G_{2306604}$	10,3	8,7	13,1	$\chi^2=2,32$ , p=0,127



### 4.3.2 Analiza roli polimorfizmu Gly482Ser *PGC-1α* w AD

Częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T, Gly482Ser) *PGC-1α* w badanych grupach znajdują się w równowadze Hardy'ego i Weinberga ( $p > 0,05$ ). Jedynie w grupie mężczyzn z LOAD stwierdzono odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga ( $p = 0,030$ ). Zidentyfikowano istotną statystycznie asocjację genotypów polimorfizmu c.1444C>T z ryzykiem LOAD ( $p = 0,048$ , Tab. 37). Po stratyfikacji badanych ze względu na płeć, zależność ta była istotna w grupie mężczyzn ( $p = 0,024$ ). Stwierdzono, że heterozygotyczna postać polimorfizmu c.1444C>T zwiększa ryzyko LOAD ( $p = 0,017$ ). W grupie mężczyzn genotyp TT jest powiązany ze zmniejszonym ryzykiem LOAD ( $p = 0,024$ ).

**Tabela 37.** Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) *PGC-1α* w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu  $\chi^2$  lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

PGC-1α, c.1444C>T	Chorzy z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	Kobiety z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna- kobiety, n (%)	Mężczyźni z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna- mężczyźni, n (%)
<i>Genotypy</i>						
CC	196 (46,44)	168 (52,83)	119 (43,75)	120 (52,17)	77 (51,33)	48 (54,54)
CT	195 (46,21)	119 (37,42)	127 (46,69)	89 (38,70)	68 (45,33)	30 (34,10)
TT	31 (7,35)	31 (9,75)	26 (9,56)	21 (9,13)	5 (3,34)	10 (11,36)
Test $\chi^2$ (df=2)	$p = 0,048$		$p = 0,155$		$p = 0,024$	
CT vs. CC+TT	$p = 0,017$ [OR=1,44, 95% CI 1,07-1,93]		$p = 0,071$ [OR=1,39, 95% CI 0,97-1,98]		$p = 0,089$ [OR=1,60, 95% CI 0,93- 2,76]	
TT vs. CC+CT	$p = 0,243$ [OR=0,73, 95% CI 0,44-1,24]		$p = 0,870$ [OR=1,05, 95% CI 0,57-1,92]		$p = 0,024$ [OR=0,27, 95% CI 0,09- 0,81]	
TT+CT vs. CC	$p = 0,085$ [OR=1,29, 95% CI 0,96-1,73]		$p = 0,0597$ [OR=1,40, 95% CI 0,99-2,00]		$p = 0,632$ [OR=1,14, 95% CI 0,67- 1,93]	
<i>Allele</i>						
C	587 (69,55)	455 (71,54)	365 (67,10)	329 (71,52)	222 (74,0)	126 (71,59)
T	257 (30,45)	181 (28,45)	179 (32,90)	131 (28,48)	78 (26,0)	50 (28,41)
Test $\chi^2$	$p = 0,406$ [OR=0,91, 95% CI 0,72-1,14]		$p = 0,130$ [OR=0,81, 95% CI 0,62-1,06]		$p = 0,567$ [OR=1,13, 95% CI 0,74- 1,71]	

Uzyskano, że polimorfizm rs8192678 na tle pozostałych czynników nie wpływa w sposób istotny na ryzyko LOAD ( $p = 0,898$ , OR=0,98, 95% CI 0,75-1,28, wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej). Nie stwierdzono wpływu genotypów i alleli polimorfizmu c.1444C>T na ryzyko EOAD (Tab. S17, Supplement). Z uwagi na niską liczebność grupy EOAD nie wykonano stratyfikacji ze względu na płeć.

Analiza regresji logistycznej wskazała na istnienie interakcji pomiędzy statusem *APOE4* (*APOE4+* vs. *APOE4-*) a genotypami polimorfizmu c.1444C>T ( $p = 0,008$ , OR=0,50, 95% CI 0,30-0,83). Stosując analizę synergii wykazano, że *APOE4* i polimorfizm c.1444C>T są w relacji antagonistycznej ( $p = 0,00099$ , SF=0,41). Stwierdzono także istotną statystycznie zależność pomiędzy genotypem *PGC-1α* a ryzykiem LOAD u osób o statusie *APOE4-* ( $p = 0,006$ ). Za tę zależność odpowiada allel T polimorfizmu rs8192678 – nosicielstwo przynajmniej jednego allelu T (482Ser), przy braku allelu *APOE4* wiąże się z ok. dwukrotnym wzrostem ryzyka LOAD ( $p = 0,003$ , Tab. 38). U osób o statusie *APOE4+* nie stwierdzono wpływu allelu T ( $p = 0,264$ ).



**Tabela 38.** Współwystępowanie genotypu polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) z nosicielstwem allelu *APOE4* w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).

<i>PGC-1a</i> c.1444C>T	LOAD, n (%)		K, n (%)		LOAD, n (%)		K, n (%)	
	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>
CC	121 (50,21)	27 (42,19)	75 (41,44)	141 (55,51)				
CT	102 (42,32)	27 (42,19)	93 (51,38)	92 (36,22)				
TT	18 (7,47)	10 (15,62)	13 (7,18)	21 (8,27)				
Test $\chi^2$ (df=2)	$\chi^2=4,32$ , p=0,114				$\chi^2=10,1$ , p=0,006			
TT vs. CC+CT*	p=0,053 [OR=0,44, 95% CI 0,19-0,998]				p=0,721 [OR=0,86, 95% CI 0,42-1,76]			
TT+CT vs. CC*	p=0,264 [OR=0,724, 95% CI 0,41-1,26]				p=0,003 [OR=1,78, 95% CI 1,21-2,62]			

\*dwustronny dokładny test Fishera

Również u kobiet o statusie *APOE4-* stwierdzono istotny statystycznie związek pomiędzy nosicielstwem przynajmniej jednego allelu T a podwyższonym ryzykiem LOAD (p=0,012, Tab. 39).

W grupie mężczyzn genotyp TT zmniejsza ryzyko LOAD u nosicieli o statusie *APOE4+* (p=0,020).

**Tabela 39.** Współwystępowanie genotypu polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) z nosicielstwem allelu *APOE4*, rozpatrywane oddzielnie w grupie kobiet i mężczyzn z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).

<i>PGC-1a</i> c.1444C>T	Kobiety, n(%)				Mężczyźni, n (%)			
	LOAD		K		LOAD		K	
	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4+</i>	<i>APOE4-</i>	<i>APOE4-</i>
CC	71 (47,02)	19 (43,18)	48 (39,67)	101 (54,30)	50 (55,55)	8 (40,0)	27 (45)	40 (58,82)
CT	65 (43,04)	19 (43,18)	62 (51,24)	70 (37,63)	37 (41,11)	8 (40,0)	31 (51,67)	22 (32,35)
TT	15 (9,94)	6 (13,64)	11 (9,09)	15 (8,07)	3 (3,33)	4 (20,0)	2 (3,33)	6 (8,82)
Test $\chi^2$ (df=2)	p=0,762				p=0,014			
TT vs. CC+CT	p=0,580, OR=0,70, 95% CI 0,25-1,92*				p=0,020, OR=0,14, 95% CI 0,03-0,68*			
TT+CT vs. CC	p=0,653, OR=0,86, 95% CI 0,43-1,69				p=0,156, OR=1,75, 95% CI 0,87-3,52			

\*Test dwustronny dokładny Fishera

Nie stwierdzono różnic w wieku wystąpienia pierwszych objawów LOAD wśród nosicieli genotypu CC (74,4±5,15), CT (74,5±5,96) i TT (76,4±5,58) polimorfizmu rs8192678 (ANOVA, p=0,177). Porównując nosicieli genotypu TT oraz nosicieli przynajmniej jednego allelu C, obserwuje się na poziomie trendu związek genotypu TT z wyższym wiekiem zachorowania na LOAD (76,4±5,58 vs 74,4±5,56; p=0,063). Podobny trend zaobserwowano u mężczyzn (p=0,078). Nie zaobserwowano wpływu poszczególnych genotypów c.1444C>T na wiek zachorowania na EOAD (p=0,883).

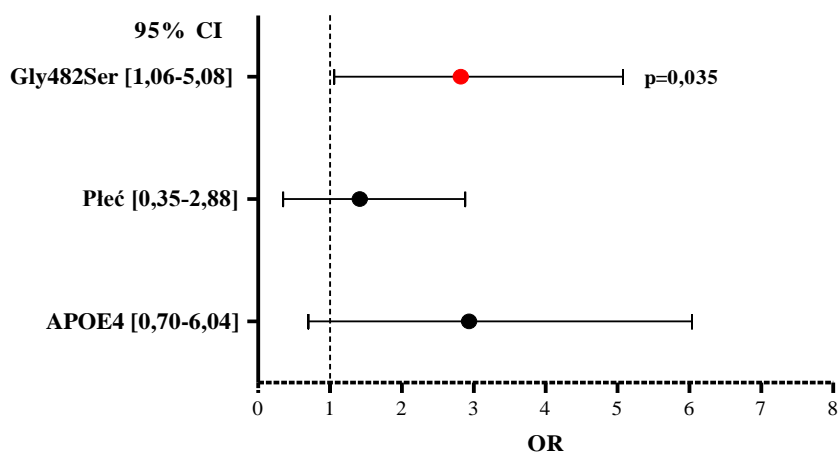
#### 4.3.2.1 Związek polimorfizmu *Gly482Ser* z konwersją łagodnych zaburzeń poznawczych do LOAD

Analiza rozkładu częstości genotypów polimorfizmu c.1444C>T (*Gly482Ser*) *PGC-1a*, wskazała na istotne statystycznie różnice pomiędzy osobami z MCI, które rozwinęły LOAD a tymi, które pozostały w stadium MCI w całej grupie (p=0,037) oraz osobno w grupie kobiet (p=0,021, OR=2,88, 95% CI 1,17-7,07). Genotyp TT (p=0,047) oraz allel T polimorfizmu c.1444C>T są istotnie powiązane z ryzykiem konwersji do LOAD u osób z MCI (p=0,028, Tab. 40).

**Tabela 40.** Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu c.1444C>T (Gly482Ser) *PGC-1α* u osób, które rozwinęły LOAD po stadium MCI (n=23) oraz u tych, którzy dotąd pozostają w stadium MCI (n=77).

<i>PGC-1α</i> , c.1444C>T	MCI>LOAD, n (%)	Pozostali z MCI, n (%)
<i>Genotypy</i>		
CC	7 (30,43)	40 (51,95)
CT	12 (52,17)	34 (44,16)
TT	4 (17,39)	3 (3,90)
Test $\chi^2$ (df=2)	p=0,037	
TT vs. CC+CT*	p=0,047 (OR=5,19, 95% CI 1,07-25,2)	
TT+CT vs. CC*	p=0,096 (OR=2,47, 95% CI 0,91-6,68)	
<i>Allele</i>		
C	26 (56,52)	114 (74,03)
T	20 (43,48)	40 (25,97)
Test Fishera*	p=0,028, OR=2,19, 95% CI 1,10-4,35	

\*Dwustronny dokładny test Fishera



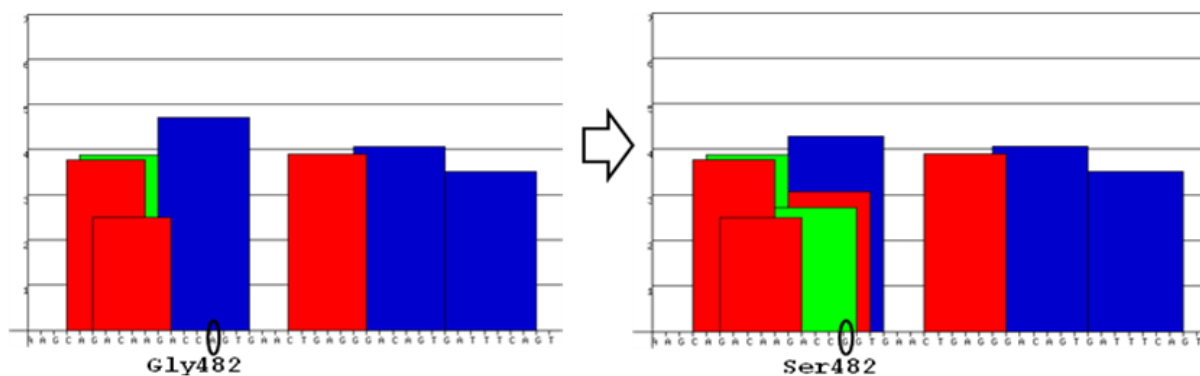
**Ryc. 29.** Wynik wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (polimorfizm c.1444C>T (Gly482Ser), płeć oraz status *APOE4*) przeprowadzonej w grupie osób, które rozwinęły AD po stadium MCI w porównaniu z tymi, którzy znajdują się nadal w stadium MCI.

Wyniki te potwierdziła wieloczynnikowa analiza regresji logistycznej (uwzględniająca status *APOE4*, płeć oraz genotypy polimorfizmu c.1444C>T *PGC-1α*), co przedstawiono na Ryc. 29.

Analiza sekwencji zawierającej wariant C lub T polimorfizmu c.1444C>T z wykorzystaniem programu analizującego przyłączanie się czynników splicingowych (ESEfinder) pokazała, że allel T może być związany z powstaniem dodatkowego miejsca wiązania się czynnika SF2/ASF i SRp40 oraz obniżeniem siły wiązania się czynnika SC35 (Tab. 41, Ryc. 30). Zatem podstawienie c.1444C>T może potencjalnie wpływać na splicing transkryptu *PGC-1α*.

**Tabela 41.** Zestawienie białek SR, których przyłączanie się do sekwencji c.1444C i c.1444T jest odmienne. ESEfinder ocenia siłę wiązania czynnika i określa ją podając wartość parametru *Score*. Białkom SR przypisano kolory i na Ryc. 34 przedstawiono ich wiązanie się do sekwencji prawidłowej i zmutowanej.

Białka SR	c.1444C	c.1444T
SF2/ASF	Score=0	Score= 3,06
SC35	Score=4,71	Score=4,27
SRp40	Score=0	Score=2,72



**Ryc. 30. Wynik zastosowania programu ESEfinder dla c.1444C>T.** Białkom SR przedstawionym w Tab. 41 przypisano kolory i na rycinie przedstawiono ich wiązanie się do sekwencji prawidłowej i zmutowanej.

➤ Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że u nosicieli allelu *APOE4* polimorfizm Gly482Ser nie stanowi czynnika ryzyka zachorowania. Jednak nabiera on znaczenia u osób o statusie *APOE4*<sup>-</sup>. Ponadto 482Ser sprzyja konwersji z MCI do LOAD. Analiza *in silico* wskazuje, że podstawienie c.1444C>T wpływa na splicing transkryptu *PGC-1a*.

### 4.3.3 Analiza związku wybranych polimorfizmów genu *HFE* z ryzykiem AD

#### 4.3.3.1 Polimorfizm His63Asp *HFE*

Przeprowadzono analizę alleli i genotypów dwóch polimorfizmów genu *HFE*, His63Asp oraz Cys282Tyr, w grupach chorych z LOAD, EOAD, u osób z diagnozą MCI oraz w grupie kontrolnej. Częstości genotypów i alleli polimorfizmu His63Asp w badanych grupach znajdują się w równowadze Hardy'ego i Weinberga ( $p > 0,60$ ). Nie stwierdzono związku genotypów polimorfizmu His63Asp z wiekiem zachorowania na EOAD ( $p = 0,374$ ) oraz LOAD ( $p = 0,494$ ). W grupie LOAD nie wystąpiły różnice w średnim wieku zachorowania u nosicieli His63Asp w porównaniu z homozygotami pod względem allelu His63, także po stratyfikacji grupy badanej ze względu na płeć ( $p > 0,05$ ). Z uwagi na niską liczebność grupy chorych na EOAD, nie dokonano stratyfikacji ze względu na płeć.

Nie stwierdzono różnic w częstościach poszczególnych alleli ( $p = 0,082$ ) i genotypów ( $p = 0,131$ ) polimorfizmu His63Asp pomiędzy grupą kontrolną a grupą LOAD (Tab. S18, Suplement). Również w grupie osób z EOAD polimorfizm His63Asp nie ma wpływu na zachorowanie (Tab. S18).

Po podzieleniu badanych ze względu na status *APOE4*, nie stwierdzono różnic częstości genotypu prawidłowego (wt) i zawierającego przynajmniej jeden allel zmutowany. W grupie kobiet zaobserwowano (na granicy istotności statystycznej) związek nosicielstwa allelu zmutowanego His63Asp i *APOE4* z podwyższonym ryzykiem zachorowania na LOAD (Tab. S19, Suplement).

Nie stwierdzono związku polimorfizmu His63Asp z konwersją do LOAD (Tab. S18, Suplement). Częstości alleli i genotypów His63Asp nie różniły się pomiędzy osobami z diagnozą MCI, które rozwinęły później LOAD a tymi, którzy nie rozwinęły LOAD i/lub pozostali w stadium MCI (odpowiednio  $p = 0,148$ ,  $p = 176$ , Tab. S18). Wśród osób z diagnozą MCI, które rozwinęły LOAD

---

nie stwierdzono związku homozygotyczności pod względem allelu 63Asp z wiekiem konwersji ( $p=0,750$ ) ani z długością okresu pomiędzy diagnozą MCI a rozwinięciem LOAD ( $p=0,217$ ).

➤ Nie stwierdzono związku genotypów i alleli polimorfizmu His63Asp z ryzykiem EOAD, LOAD ani z ryzykiem konwersji z MCI do LOAD.

#### **4.3.3.2 Polimorfizm Cys282Tyr HFE**

Nie stwierdzono różnic w częstości alleli i genotypów polimorfizmu Cys282Tyr (G845A) pomiędzy chorymi na LOAD a grupą kontrolną, także po podzieleniu badanych ze względu na płeć (Tab. S20; Supplement). W grupie EOAD stwierdzono obecność tylko allelu G845 ( $p=0,061$ , dokładny dwustronny test Fishera). Nie stwierdzono wpływu polimorfizmu G845A na wiek zachorowania na LOAD. Nie wykryto różnic w wieku zachorowania pomiędzy nosicielami genotypu GG a posiadaczami genotypu GA i AA ( $p=0,958$ ).

Nie stwierdzono różnic w częstości występowania prawidłowej i zmutowanej formy Cys282Tyr u osób o statusie *APOE4+* i *APOE4-*, także po stratyfikacji badanych pod względem płci (Tab. S21). Nie wykazano też różnic w częstości genotypów prawidłowych i zmutowanych polimorfizmów His63Asp oraz Cys282Tyr u osób o statusie *APOE4+* i *APOE4-* w grupie chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. S22).

Wśród osób z diagnozą MCI, które rozwinęły LOAD nie stwierdzono związku posiadania alleli i genotypów polimorfizmu Cys282Tyr z wiekiem konwersji ( $p=0,745$ ) ani z długością okresu pomiędzy diagnozą MCI a rozwinięciem AD ( $p=0,967$ ). Częstości alleli i genotypów G845A nie były istotnie różne pomiędzy grupą osób z rozpoznaniem MCI a grupą kontrolną (Tab. S20).

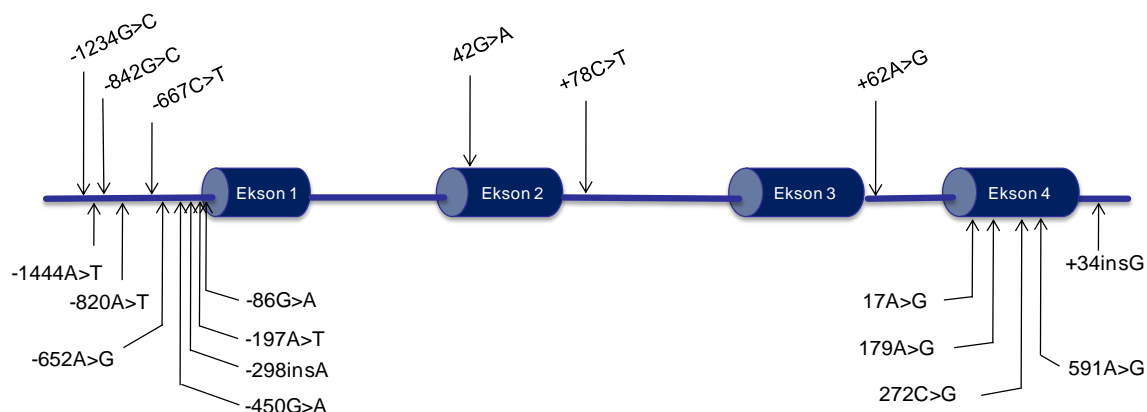
Analiza z wykorzystaniem programu Haploview wykazała, że polimorfizmy His63Asp oraz Cys282Tyr *HFE* nie są sprzężone ( $D'=0,9$ ;  $LOD=0,74$ ). Analiza kombinacji genotypów tworzonych przez oba polimorfizmy wyłoniła trzy najczęstsze haplotypy (Tab. S23), jednak żaden z nich nie jest istotnie powiązany z ryzykiem LOAD. Zestawienie obu badanych polimorfizmów *HFE*, uwzględniające nosicielstwo genotypu składającego się z dwóch alleli dzikich lub przynajmniej jednego allelu zmutowanego, u osób z LOAD oraz w grupie kontrolnej, nie wykazało różnic w częstości haplotypów pomiędzy badanymi (Tab. S24).

➤ Podsumowując, nie stwierdzono związku genotypów i alleli polimorfizmu Cys282Tyr z ryzykiem EOAD, LOAD. Występuje związek nosicielstwa przynajmniej jednego allelu G845A ze zwiększonym ryzykiem konwersji z MCI do LOAD ( $p=0,021$ ),

#### **4.3.4 Analiza związku zmienności PIN1 z ryzykiem AD**

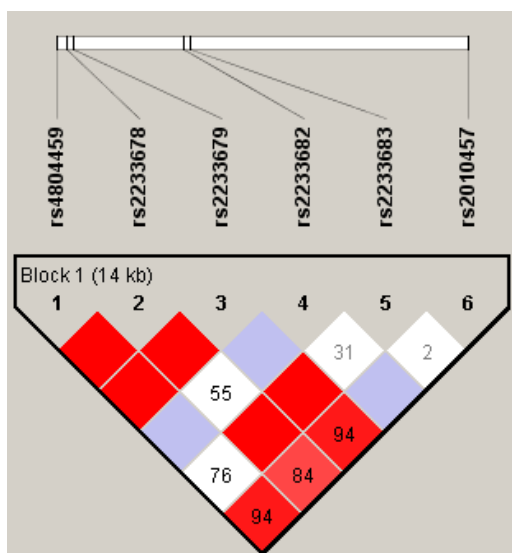
W analizowanej sekwencji genu *PIN1* wraz z jego regionem promotorowym (por. Ryc. 31) stwierdzono obecność osiemnastu polimorfizmów: rs7247933, rs4804459, rs2233678, rs35794537, rs2233679, rs2233680, rs7250788, rs35973416, rs28589723, rs2233681, rs2233682, rs2233683, rs2010457, rs11540415, rs34412035, rs11540414, rs3178950, rs35575918). Spośród nich sześć

(rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2233682, rs2233683, rs2010457) występuje w postaci heterozygotycznej w badanej grupie i zostało poddane analizie.



**Ryc. 31. Zestawienie 18 polimorfizmów w analizowanej sekwencji genu *PINI* oraz jego regionu promotorowego.** Zamiast numerów identyfikacyjnych polimorfizmów (rs) podano ich względne położenie w sekwencji *PINI*. Polimorfizmy przedstawione w górnej części schematu stanowią sześć heterozygotycznych zmian w populacji polskiej (rs4804459, -1234G>C; rs2233678, -842G>C; rs2233679, -667C>T; rs2233682, c.99G>A, 42G>A w eksonie 2; rs2233683, c.278+78C>T, +78C>T względem eksonu 2, rs2010457, c.382+62A>G, +62A/G względem eksonu 3).

Wspomnianych sześć polimorfizmów pogrupowano w haplotypy oraz wyznaczono nierównowagę sprzężeń pomiędzy nimi, stosując program Haploview. Polimorfizmy rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2010457 pozostają w nierównowadze sprzężeń w grupie EOAD, LOAD oraz w grupie kontrolnej (Ryc. 32).



**Ryc. 32. Przedstawienie nierównowagi sprzężeń pomiędzy 6 polimorfizmami znajdującymi się na odcinku o długości 14 kb w genie *PINI*.** Nierównowaga sprzężeń była badana między parami polimorfizmów. W kwadratach podano wartości  $D'$ . Kwadraty bez podanej wartości liczbowej oznaczają, że  $D'=1$ , czyli zachodzi całkowita nierównowaga sprzężeń pomiędzy dwoma polimorfizmami. Czerwone kwadraty reprezentują pary polimorfizmów z wartością LOD dla  $LD \geq 2$ , niebieskie kwadraty oznaczają, że  $D'=1$ , ale  $LOD < 2$ , a białe kwadraty oznaczają  $LOD < 2$  i  $D' < 1$ .  $D'$  oznacza znormalizowany współczynnik nierównowagi.

Polimorfizmy rs2233682 i rs2233683 charakteryzowała niska częstość występowania rzadszego allelu. Polimorfizmy rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2233682, rs2233683, rs2010457 tworzą 3 najczęstsze haplotypy o częstości >8%, przedstawione dokładniej w Tab. S25 (Suplement). Nie stwierdzono różnic w częstościach badanych haplotypów pomiędzy grupą chorych z EOAD, LOAD a grupą kontrolną ( $p > 0,050$ ).

---

Także częstości genotypów i alleli badanych polimorfizmów nie różniły się istotnie (Maruszak i wsp., 2009b). Rozkłady częstości genotypów i alleli genu *PIN1* w badanych grupach były w równowadze Hardy'ego i Weinberga ( $p > 0,05$ ). Stratyfikacja grup badanych ze względu na nosicielstwo allelu *APOE4* nie miała wpływu na rozkład alleli i genotypów ( $p > 0,1$ ). Ponadto, żaden z badanych polimorfizmów nie wpływa na wiek wystąpienia pierwszych objawów AD ( $p > 0,1$ ).

#### **4.3.4.1 Polimorfizmy *PIN1* a zmienność *mtDNA* i pozostałych badanych genów jądrowych**

Wykonano analizę występowania polimorfizmów w genie *PIN1* na tle badanych zmian w genomie mitochondrialnym oraz pozostałych analizowanych wariantów w genach jądrowych (*TFAM*, *PGC-1 $\alpha$* , *HFE*). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą chorych na AD a grupą kontrolną w występowaniu alleli i genotypów polimorfizmów w genie *PIN1* na tle zmian w genomie mitochondrialnym ( $p > 0,05$ ). Nie wykryto zależności pomiędzy mitochondrialnymi haplogrupami a zmiennością genu *PIN1* ( $p > 0,05$ ).

##### **4.3.4.1.1 Analiza interakcji pomiędzy polimorfizmami w *PIN1* i *HFE***

W związku z doniesieniami o oddziaływaniach pomiędzy *PIN1* i *HFE* na poziomie produktów białkowych (Hall i wsp., 2010), postanowiono sprawdzić interakcję między kodującymi je genami. Nie stwierdzono związku pomiędzy badanymi polimorfizmami w genie *PIN1* a His63Asp i Cys282Tyr w *HFE* w grupie chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną ( $p > 0,050$ ). Występuje istotna statystycznie interakcja pomiędzy polimorfizmem rs2010457 (c.382+62A>G) *PIN1* a rs1799945 (His63Asp) *HFE* ( $p = 0,021$ , OR=4,26, 95% CI 1,24-14,62), co zbadano metodą regresji logistycznej (uwzględniająca zmienne: płeć, nosicielstwo rs2010457, rs1799945 oraz interakcję rs2010457 z rs1799945) w grupie chorych na EOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast efekty pojedyncze tych polimorfizmów w modelu regresji logistycznej nie są istotne statystycznie (rs2010457:  $p = 0,449$ , OR=0,76, 95% CI 0,37-1,54; rs1799945:  $p = 0,290$ , OR=0,56, 95% CI 0,19-1,65).

Analiza regresji logistycznej badająca interakcję pomiędzy polimorfizmami genu *PIN1* a Cys282Tyr w grupie chorych na LOAD, EOAD w porównaniu z grupą kontrolną nie wykazała związku między tymi polimorfizmami ( $p > 0,050$ ). Analiza synergii pomiędzy rs2010457 i rs1799945 w grupie chorych na EOAD w porównaniu z grupą kontrolną wykazała istotną statystycznie zależność między tymi polimorfizmami o charakterze synergistycznym (SF=8,73,  $p = 0,009$ , OR=3,0, 95% CI 1,72-44,45).

➤ Podsumowując analizę polimorfizmów *PIN1*, nie stwierdzono ich roli w ryzyku LOAD. Polimorfizm rs2010457 *PIN1* wykazuje istotną statystycznie interakcję o charakterze synergii z rs1799945 *HFE* w grupie EOAD.

#### 4.3.4.2 Zidentyfikowane nowe warianty w sekwencji PIN1

U trzech chorych z EOAD zidentyfikowano trzy różne warianty, nieopisane w literaturze (c.24G>T, c.58+64C>T, c.382+105C>T). W grupie chorych z LOAD zidentyfikowano jeden nowy wariant w regionie promotorowym, 1187 pz w kierunku 5' przed miejscem startu translacji (Ryc. 33).



Ryc. 33. *PIN1* z zaznaczonymi pozycjami zidentyfikowanych mutacji u chorych z EOAD i LOAD.

Ponadto, u 2 chorych z LOAD wykryto wariant stwierdzony także w grupie EOAD, c.58+64C>T. Łącznie, zidentyfikowano 4 nowe warianty genu *PIN1*. Zestawienie informacji na temat nosicieli zidentyfikowanych wariantów przedstawiono w Tab. 42. Wszystkie zidentyfikowane nowe zmiany w *PIN1* są pojedynczymi podstawieniami nukleotydowymi i były nieobecne w grupie kontrolnej. Warianty g.9805833T>C, c.24C>T oraz c.382+105C>T są zlokalizowane na najbardziej powszechnych haplotypach, CGTGCA/GGCGCG. Nosicielki wariantu c.58+64C>T należały do diplotypów CGTGCA/CGCGCA, CCCGCG/CGCACA i CCCGTA/CGCACA.

Cztery warianty są obecne u nosicieli mitochondrialnej haplogrupy H (H1, H6, H5a, H24), jeden u nosiciela haplogrupy J (J2b) oraz jeden u nosiciela podhaplogrupy U (U5b1b).

Tabela 42. Podsumowanie danych o zidentyfikowanych zmianach w sekwencji *PIN1*. Wywiad z rodziną był podstawą postawienia hipotezy o rodzinnej historii otępienia.

Wariant <i>PIN1</i>	Płeć	Wiek	Rodzinna historia otępienia (+/-)	<i>APOE</i>	Haplogrupa mitochondrialna
<b>g.9805834T&gt;C</b>	M	70 lat	+ (matka miała problemy z pamięcią i wykazywała zaburzenia zachowania od 60 r.ż.)	<i>APOE3/4</i>	H1
<b>c.24G&gt;T</b>	K	52 lata	+ (matka oraz matka ojca)	<i>APOE3/3</i>	J2b
<b>c.58+64C&gt;T</b>	K	51 lat	+ (ojciec)	<i>APOE4/4</i>	U5b1b
	K	71 lat	+ (brat matki)	<i>APOE3/4</i>	H6
	K	70 lat	+ (ojciec w wieku osiemdziesięciu kilku lat zachorował na AD, siostra w wieku 66 lat zaczęła mieć problemy psychiatryczne)	<i>APOE3/4</i>	H5a
<b>c.382+105C&gt;T</b>	M	48 lat	+ (ojciec miał otępienie, zmarł w wieku 73 lat)	<i>APOE3/4</i>	H24

M- mężczyzna, K- kobieta; + oznacza obecność rodzinnej historii otępienia na podstawie wywiadu z bliskimi chorego/chorej; Wiek – wiek chorego, kiedy wystąpiły u niego pierwsze objawy AD.

Potencjalne znaczenie zidentyfikowanych wariantów opisano poniżej, opierając się o analizę bioinformatyczną i jeśli to było możliwe - o analizę ekspresji.

##### 4.3.4.2.1 Analiza bioinformatyczna wariantu g.9805833T>C

Program MatInspector, wykorzystany do analizy *in silico* wariantu zlokalizowanego w regionie promotorowym *PIN1*, g.9805833T>C, pokazał, że g.9805833T>C może powodować utratę

---

miejsca wiązania się szeregu czynników transkrypcyjnych, w tym: białek oddziałujących z FAST-1 SMAD, rodziny białek PAR/bZIP, czynnika transkrypcyjnego wiążącego się z sekwencją CCAAT (*Ccaat/Enhancer Binding Protein*, C/EBP), rodziny białek Ikaros zawierających motyw palca cynkowego (*Ikaros zinc finger family*). Taka sama analiza wykonana przez program Mapper potwierdziła utratę miejsc wiązania dla C/EBP i rodziny białek PAR/bZIP. W obu analizach miejsce wiązania C/EBP otrzymało wyższe wyniki w podobieństwie do matrycy w porównaniu z rodziną białek PAR/bZIP. Analiza całego regionu promotorowego *PIN1* programem Mapper wyłoniła jedno, a programem MatInspector dwa miejsca wiązania się białek z rodziny C/EBP do promotora *PIN1*. Hipotezę dotyczącą interakcji *PIN1* i C/EBP, angażującą czynnik transkrypcyjny E2F – regulator ekspresji *PIN1*, przedstawiono szerzej w pracy dotyczącej udziału *PIN1* w AD (Maruszak i wsp., 2009b). Zniesienie wiązania się przynajmniej jednego miejsca dla C/EBP w pozycji g.9805833T>C może prowadzić do zaburzenia aktywacji *PIN1* przez E2F.

#### **4.3.4.2.2 Analiza bioinformatyczna mutacji c.382+105C>T**

Analiza z wykorzystaniem programów Automated Splice Site Analysis i ESEfinder nie wykazała roli wariantu c.382+105C>T w zmianie przyłączania czynników splicingowych.

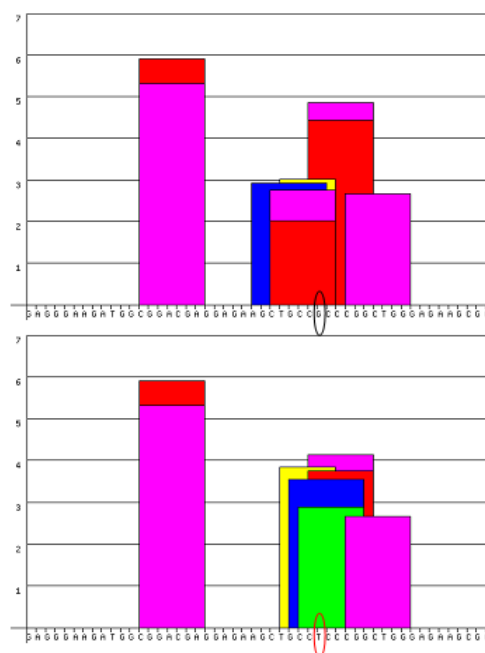
#### **4.3.4.2.3 Analiza bioinformatyczna wariantu c.24G>T**

Wariant c.24G>T jest synonimicznym podstawieniem (CCG>CCT) w kodonie 8 dla proliny, biorącej udział w tworzeniu domeny WW *PIN1*. Zarówno sekwencja DNA, jak i białka wykazują w tym miejscu wysoki stopień konserwowania między gatunkami (poza *Mus musculus*, u której w DNA w miejscu cytozyny jest adenozyne).

Analiza sekwencji eksonu 1 z wykorzystaniem programu ESEfinder wykazała, że wspomniana substytucja znajduje się w miejscu potencjalnego wiązania się pięciu czynników uczestniczących w splicingu. Zidentyfikowana transwersja może potencjalnie powodować zmianę wiązania się kilku białek SR (Ryc. 34), czego szczegółowe omówienie zawarto w pracy Maruszak i wsp. (2009b).



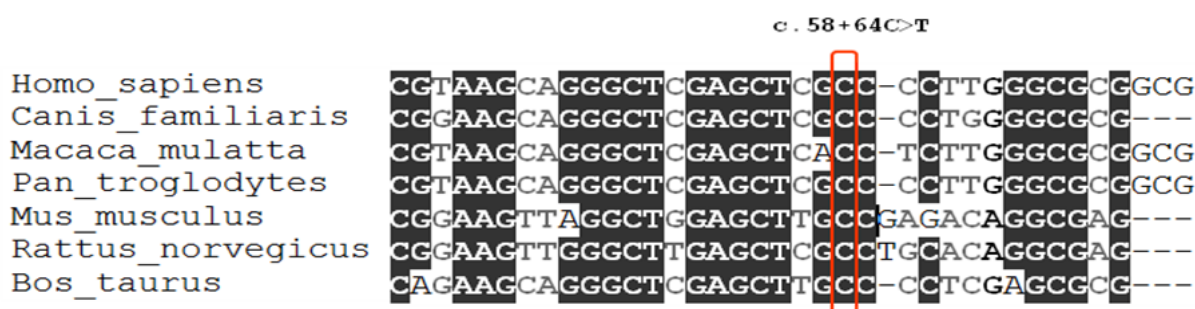
Białka SR	c.24G	c.24T
SF2/ASF (1)	Score=2.02	-
SF2/ASF (2)	Score=4.42	↓ Score=3.75
SF2/ASF (IgM-BRCA1)	Score= 2.76	↑ Score= 4.13
SC35 (1)	Score=2.93	-
SC35 (2)	-	↑ Score=3.54
SRp40	-	Score=2.88
SRp55	Score=3.02	↑ Score=3.83



**Ryc. 34. Wpływ substytucji c.24G>T na przyłączanie się eksonowych czynników wzmacniających splicing na podstawie analizy podstawienia z wykorzystaniem programu ESEfinder.** ESEfinder ocenia siłę wiązania czynnika i określa ją poprzez wartość *Score*. Przedstawiono wyniki tylko dla tych czynników, które przyłączają się do sekwencji dzikiej i/lub zmutowanej. W środkowej kolumnie tabeli pokazano wpływ allele dzikiego, natomiast w kolumnie z prawej strony – potencjalny wpływ allele zmutowanego, c.24T. Pozioma kreska oznacza brak miejsca wiązania się, strzałka skierowana do dołu-obniżenie siły wiązania się, a strzałka skierowana do góry - wzrost siły wiązania czynnika wzmacniającego splicing. Białkom SR przypisano kolory i przedstawiono ich wiązanie się do sekwencji dzikiej i zmutowanej.

#### 4.3.4.2.4 Analiza bioinformatyczna wariantu c.58+64C>T

Wariant c.58+64C>T jest zlokalizowany w miejscu konserwowanym w DNA ssaków (Ryc. 35). Został on zidentyfikowany u 3 kobiet z FAD. Jedna z nich chorowała na postać wczesnoobjawową, a dwie na późnoobjawową. Nie ma danych dotyczących możliwego pokrewieństwa tych chorych.



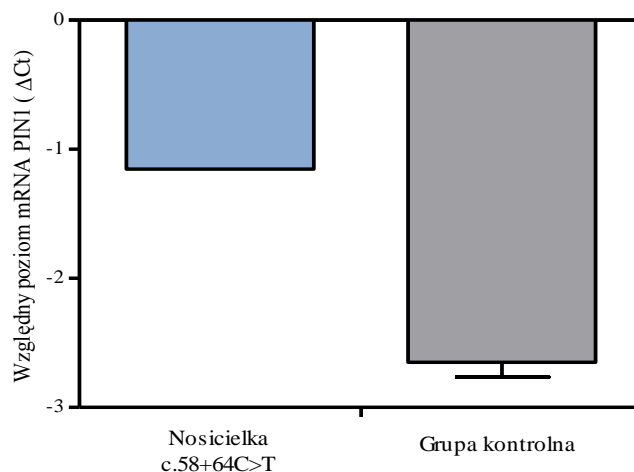
**Ryc. 35. Porównanie fragmentu sekwencji *PIN1* z zaznaczonym na pomarańczowo miejscem, w którym zaszło podstawienie c.58+64C>T.**

Zastosowanie programu RegRNA pokazało, że w wyniku substytucji c.58+64C>T może powstać miejsce wiązania dwóch intronowych czynników wzmacniających splicing - motyw AGGG (na nici +) oraz motyw CTGC (na nici-). Pojawienie się kolejnego motywu (A/U)GGG poza trzema innymi w części 5' intronu 1 mogłoby również oddziaływać na splicing, co jest opisywane w literaturze (Maruszak i wsp., 2009b).

Analiza z wykorzystaniem programu Automated Splice Site Analysis pokazała, że substytucja c.58+64C>T może zwiększać 14,3-krotnie siłę potencjalnego miejsca wiązania wzmacniacza splicingu SC35, usytuowanego 2 nt przed zmianą, w porównaniu z sekwencją dziką. Według bazy danych Aceview wykryto alternatywny transkrypt *PINI* (hApr07, BC031971), pozbawiony eksonu 1, zawierający dwa nowe eksony, powstające z sekwencji intronu 1. Substytucja c.58+64C>T znajduje się w obszarze pierwszego z nich. Opisany w bazie Aceview transkrypt został wykryty w jądrach męskich i jego przewidzianą lokalizacją są mitochondria. Możliwe, że zaistniała zmiana, zwiększająca siłę wiązania SC35 może wpływać na zajście alternatywnego splicingu w innych tkankach.

#### 4.3.4.2.5 Analiza ekspresji *PINI* u nosicielki c.58+64C>T

Spośród nosicielek wariantu c.58+64C>T tylko u jednej było możliwe wykonanie analizy ekspresji *PINI* na poziomie mRNA z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Ekspresja *PINI* we krwi obwodowej osoby niosącej wspomnianą mutację, w odniesieniu do genu referencyjnego (*SDHA*) oraz w porównaniu z grupą kontrolną (n=4), była 2,82 razy niższa (Ryc. 36).



**Ryc. 36. Względny poziom ekspresji *PINI* u nosicielki wariantu c.58+64C>T oraz w grupie kontrolnej.** Wykres przedstawia różnicę poziomu progowego ( $Ct$ ) dla genu badanego (*PINI*) oraz genu referencyjnego (*SDHA*),  $\Delta Ct$ , w grupie kontrolnej i u nosicielki substytucji.

➤ Podsumowując, zidentyfikowano 4 nowe warianty *PINI* (c.24G>T, c.58+64C>T, c.382+105C>T oraz g.9805834T>C), stanowiące pojedyncze podstawienia nukleotydowe, nieobecne w grupie kontrolnej. Analiza *in silico* przewidziała rolę trzech wariantów (g.9805833T>C, c.24G>T oraz c.58+64C>T) w modyfikowaniu przyłączenia się czynników transkrypcyjnych, bądź czynników biorących udział w splicingu. Wariant c.58+64C>T jest związany z 2,82 razy niższą ekspresją *PINI*.

## 5 DYSKUSJA

Niniejsza praca przedstawia analizę zmienności wybranych fragmentów genomów mitochondrialnego i jądrowego oraz próbę określenia zależności pomiędzy zidentyfikowanymi zmianami w kontekście choroby Alzheimera. Poniżej przedyskutowano znaczenie zidentyfikowanych czynników ryzyka AD oraz czynników protekcyjnych, odnosząc się do najnowszych badań dotyczących tej choroby oraz – szerzej – do kwestii związanych z określaniem podłoża genetycznego chorób neurozwyrodnieniowych.

### 5.1 Allel *APOE4* czynnikiem ryzyka LOAD, ale nie w grupie stulatków

Uzyskane wyniki potwierdziły istotną rolę allelu *APOE4* jako czynnika ryzyka LOAD, co jest zgodne z dotychczasowymi doniesieniami na temat udziału wspomnianego allelu w etiopatogenezie LOAD (Mahley i wsp., 2006). Stwierdzono, że osoby posiadające co najmniej jeden allel *APOE4* (status *APOE4+*) mają statystycznie ponad pięciokrotnie wyższe ryzyko zachorowania na LOAD w porównaniu z osobami o statusie *APOE4-* ( $p < 0,0001$ ). Jednakże, podobnie, jak w innych populacjach (Asada i wsp., 1996; Sobel i wsp., 1995; Perls, 2004), nie stwierdzono związku nosicielstwa allelu *APOE4* z zachorowaniem na LOAD w grupie stulatków. Częstość alleli *APOE2* i *APOE3* wraz z wiekiem rośnie, a *APOE4* maleje, co wyraźnie widać w badanej grupie stulatków, i co może być związane z opisywaną w literaturze wyższą śmiertelnością nosicieli *APOE4* (Ewbank, 2004).

Wpływ *APOE4* zależy więc od wieku badanych, co uzasadnia m.in. wprowadzenie podziału na grupy wiekowe wśród badanych. Istotnie, *APOE4* wpływa na wcześniejsze wystąpienie pierwszych objawów LOAD. Stwierdzono, że u osób o statusie *APOE4+* w wieku  $\leq 72$  lata ( $p < 0,0001$ ,  $OR = 6,28$ ) ryzyko zachorowania jest wyższe w porównaniu z osobami *APOE4-*. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o tym, że nosicielstwo allelu *APOE4* najsilniej oddziałuje na wzrost ryzyka LOAD pomiędzy 60 i 70 r.ż. (Blacker i wsp., 1997). Uważa się, że w przebiegu AD *APOE4* najsilniej wpływa na powstawanie blaszek amyloidowych u jeszcze młodszych osób, w wieku 50-59 lat (Kok i wsp., 2009).

Proporcja liczby kobiet do liczby mężczyzn w analizowanej grupie badanej nie odbiega od stosowanych w innych badaniach nad AD (Ferrucci i wsp., 2008). Jednak nie potwierdzono postulowanego przez część badaczy wyższego ryzyka związanego z nosicielstwem *APOE4* w grupie kobiet w porównaniu z grupą mężczyzn (Farrer i wsp., 1997; Azad i wsp., 2007; Santoro i wsp., 2010). Postulowane w literaturze wyższe ryzyko AD u nosicielek allelu *APOE4* jest związane m.in. z obserwowanym silniejszym wpływem *APOE4* na patologię hipokampa i zaburzenia pamięci u płci żeńskiej (Azad i wsp., 2007). Mimo że nie stwierdzono, że płeć wpływa na zachorowanie na AD, uwzględniano ją w analizach, sprawdzając, czy nie modyfikuje działania badanych czynników ryzyka. Wyniki opisane w niniejszej rozprawie wskazują na zmiany sekwencji potencjalnie wpływające na ryzyko AD. Pokazują też, że niektóre czynniki ryzyka AD są specyficzne względem płci.

---

## 5.2 Rola zmienności mtDNA w tworzeniu ryzyka AD

### 5.2.1 Haplogrupa H i klaster HV zwiększają ryzyko zachorowania na LOAD

Wśród osób włączonych do grupy badanej znaleźli się nosiciele haplogrup, charakterystycznych dla populacji wschodnio - i południowoazjatyckiej oraz afrykańskiej. Nosiciele niespecyficznych dla populacji kaukaskiej haplogrup stanowią niewielki odsetek każdej z badanych grup - chorych z LOAD, EOAD, stulatków oraz grupy kontrolnej. Ich obecność w każdej grupie uzasadniła pozostawienie ich w strukturze badanej próby. Domieszka haplogrup niespecyficznych dla populacji kaukaskiej jest odnotowywana we wszystkich opublikowanych dotychczas badaniach i jest świadectwem migracji.

Porównanie częstości mitochondrialnych haplogrup i podhaplogrup w badanych grupach wskazało, że istotne różnice występują jedynie pomiędzy grupą LOAD i grupą kontrolną. Nie wykazano związku haplogrup z ryzykiem EOAD czy wystąpieniem LOAD u stulatków. Może być to związane z niską liczebnością tych grup, uniemożliwiającą wykrycie sprawczych czynników o mniejszej częstości występowania.

Najczęstszą haplogrupą we wszystkich badanych grupach jest haplogrupa H, co jest zgodne z danymi dla populacji europejskiej (Roostalu i wsp., 2007; Malyarchuk i wsp., 2002; Carrieri i wsp., 2001). Haplogrupa H w wielu pracach dotyczących udziału zmian konstytutywnych w mtDNA w chorobach neurodegeneracyjnych jest postrzegana jako referencyjna, ze względu na wysoką częstość występowania w populacji kaukaskiej (>40%) (van der Walt i wsp., 2004; Mancuso i wsp., 2007) oraz dlatego, że podhaplogrupa H2a2 została wybrana jako haplogrupa referencyjna dla ludzkiego mtDNA (Anderson i wsp., 1981). Jednakże w niniejszej pracy zastosowano inne podejście. Ze względu na to, że po 65 r.ż. wraz z wiekiem rośnie prawdopodobieństwo zachorowania na LOAD, w związku z czym LOAD dotyka około połowy populacji osób w wieku 85 lat, przyjęto, że haplogrupa występująca z tak dużą częstością (Roostalu i wsp., 2007) nie może być neutralnym czynnikiem wobec choroby niemal równie powszechnej. Dlatego w opisanych badaniach grupę odniesienia dla nosicieli danej haplogrupy stanowili nosiciele wszystkich pozostałych haplogrup.

Stosując wspomnianą metodologię wykazano, że haplogrupa H oraz klaster HV, złożony z filogenetycznie spokrewnionych haplogrup H i V, sprzyjają rozwojowi LOAD. Wyniki opisane w niniejszej rozprawie pozytywnie weryfikują wyniki uzyskane dla mniejszej grupy badanej (222 chorych na LOAD, 252 osób z grupy kontrolnej), opublikowane w 2009 r. i stanowiących pierwsze doniesienie o istotnej roli klastera HV w LOAD (Maruszak i wsp., 2009a). Należy zaznaczyć, że związek haplogrupy H z ryzykiem LOAD uzyskano dla grupy badanej pozbawionej domieszki niespecyficznych dla populacji kaukaskiej haplogrup (OR=1,41). Haplogrupa H jest także czynnikiem ryzyka osobno w grupie kobiet (OR=1,51). Podobnie jak w przypadku haplogrupy H, klaster HV jest istotnie statystycznie związany z ryzykiem LOAD (OR=1,51), także osobno w grupie kobiet (OR=1,52), podczas gdy w grupie mężczyzn zależność ta miała jedynie postać trendu.

Uzyskany wynik dla populacji polskiej jest spójny z przeprowadzoną metaanalizą dotyczącą opublikowanych wyników oraz wyników zebranych w niniejszej rozprawie. Metaanaliza wykazała, że haplogrupa H stanowi istotny czynnik ryzyka LOAD w populacji kaukaskiej (OR=1,22). Również metaanaliza dotycząca klastera HV, złożona z sześciu badań, wraz z zawartym w niniejszej rozprawie, także wykazała istotną statystycznie asocjację pomiędzy nosicielstwem klastera HV, a zachorowaniem na LOAD w populacji kaukaskiej (OR=1,25).

Warto zaznaczyć, że badania uwzględnione w metaanalizie dotyczącej haplogrupy H i klastera HV nie pokrywają się całkowicie. Niemożliwe było wykorzystanie tych samych badań, gdyż nie wszyscy ich autorzy podali częstości poszczególnych haplogrup czy klasterów, bądź np. włączali haplogrupę V do zbiorczej kategorii "inne" i z uwagi na brak informacji o frekwencji V nie można było włączyć danego badania do metaanalizy. Jednakże, wyniki obu metaanaliz wskazują, że zarówno haplogrupa H, jak i klaster HV są istotnymi czynnikami ryzyka LOAD. Wynik ten jest tym bardziej istotny, gdyż częstości mitochondrialnych haplogrup różnią się pomiędzy grupami etnicznymi, populacjami, a nawet regionami geograficznymi tego samego kontynentu (Wallace i wsp., 2003), co może mieć istotny wpływ na wyniki pojedynczych badań asocjacyjnych.

Dotychczas, jedynie w grupie Irańczyków (Persów) stwierdzono istotny związek pomiędzy nosicielstwem haplogrupy H a ryzykiem AD (Fesahat i wsp., 2007). Jednak autorzy przeprowadzili jedynie analizę jednoczynnikową, nie kontrolując wpływu innych czynników (w tym statusu *APOE4*) na ryzyko AD. Ponadto, podana przez Fesahat i wsp. (2007) częstość haplogrupy H w grupie chorych z AD (16,6% vs 3% w grupie kontrolnej) jest bardzo zbliżona do częstości H uzyskanych dla Persów w badaniu populacyjnym (16,7%) (Metspalu i wsp., 2004). Wydaje się, że wyniki te wskazują, iż grupa badana nie stanowiła reprezentatywnej próby i wobec tego nie można rozstrzygnąć o roli haplogrupy H w zachorowaniu na AD w tamtejszej populacji. Natomiast jedno później opublikowane badanie przeprowadzone w populacji europejskiej wskazuje na istnienie związku haplogrupy H z ryzykiem AD na poziomie trendu statystycznego (Krüger i wsp., 2009). Przyczyn braku istotności statystycznej można upatrywać w szeregu czynników: od wpływu konkretnego podłoża etnicznego, po różne kryteria rekrutacji grupy badanej.

Można zaproponować hipotezę, że znaczenie haplogrupy H, związanej z ryzykiem LOAD wynika z współwystępowania z innymi czynnikami obecnymi w tzw. okresie krytycznym, pokrywającym się z najsilniejszym oddziaływaniem *APOE4*. Ponieważ w grupie stulatków nie stwierdzono związku między nosicielstwem haplogrupy H czy klastera HV a zachorowaniem na LOAD ( $p > 0,05$ ), można sądzić, że prawdopodobnie nie należy rozpatrywać czynników ryzyka LOAD jako posiadających tę samą siłę w różnych stadiach życia człowieka. Potrzeba jednak dodatkowych badań, na zdecydowanie większych grupach badanych w różnym wieku dla weryfikacji tej hipotezy.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki przekonują o słuszności przyjęcia za grupę odniesienia dla nosicieli danej haplogrupy osób będących nosicielami wszystkich pozostałych haplogrup, a nie haplogrupy H, jak to było czynione dotychczas (np. van der Walt i wsp. 2004). Poza uzyskanym związkiem z LOAD, niedawno opisano także asocjację niektórych chorób psychiatrycznych z

---

haplogrupą H (np. schizofrenii) (Amar i wsp., 2007). Stwierdzono również związek haplogrupy H z otepieniem z ciałami Lewy'ego (Chinnery i wsp., 2000), chorobą Parkinsona (Khusnutdinova i wsp., 2008) oraz z chorobą Huntingtona (Arning i wsp., 2010). Wydaje się więc, że wpływ haplogrup mitochondrialnych na genetyczne podłoże podatności na choroby neurozwyrodnieniowe czy psychiczne może mieć szerszy zakres niż dotychczas przypuszczano.

### **5.2.1.1 Synergistyczna relacja pomiędzy podhaplogrupą H5 a APOE4 zwiększa ryzyko LOAD**

Wykonano szczegółową analizę podhaplogrup i podtypów haplogrupy H, próbując zrozumieć rolę haplogrupy H i klastera HV w LOAD. Założono, że konkretna podhaplogrupa lub podhaplogrupy mogłyby być odpowiedzialne za zaobserwowany związek haplogrupy H z LOAD. Jednak poza podhaplogrupą H16, którą zidentyfikowano wyłącznie w grupie LOAD, nie wystąpiły różnice w częstości pozostałych podhaplogrup H pomiędzy grupą badaną a kontrolną ( $p > 0,05$ ).

Analizując jednocześnie występowanie podhaplogrup H z allelem *APOE4*, zidentyfikowano istotną relację synergistyczną podhaplogrupy H5 z *APOE4*, świadczącą o wpływie obu czynników genetycznych na ryzyko LOAD (OR=33,13). W odróżnieniu od Santoro i wsp. (2010) nie stwierdzono istotnych różnic w częstości podhaplogrupy H5 pomiędzy grupą LOAD a grupą kontrolną. Wykazano, że posiadanie zarówno podhaplogrupy H5 oraz przynajmniej jednego allelu *APOE4* podwyższa prawdopodobieństwo zachorowania związane z samym nosicielstwem allelu *APOE4* (OR=5,12). Związek wspomnianych czynników z ryzykiem LOAD wydaje się zależeć przede wszystkim od efektu *APOE4*, wzmocnionego dodatkowo nosicielstwem podhaplogrupy H5. Jednak trudno rozstrzygnąć, jaką rolę odgrywa podhaplogrupa H5 w wykrytej interakcji. Podhaplogrupa H5 jest definiowana przez polimorfizmy w regionie niekodującym mtDNA (m.456T, m.16304C), ponadto brak danych o funkcjonalnej różnicy pomiędzy podhaplogrupą H5 a haplogrupą H. Postulowano, że podtyp H5, H5a, definiowany przez polimorfizm m.4336T>C w genie tRNA<sup>Glu</sup> jest czynnikiem ryzyka AD (Shoffner i wsp., 1993; Egensperger i wsp., 1997; Hutchin i Cortopassi, 1995). Jednak inne badania, w tym prezentowane w niniejszej rozprawie, wskazują na brak różnic w częstości H5a pomiędzy grupą LOAD i grupą kontrolną (Edland i wsp., 2002; Garcia-Lozano i wsp., 2002; Tysoe i wsp., 1996; Chagnon i wsp., 1999). Pomimo że podhaplogrupa H5 jest drugą co do częstości podhaplogrupą H w badanej grupie, liczba jej nosicieli jest niewielka (23 osoby z LOAD, 12 osób z grupy kontrolnej), stąd jej związek z ryzykiem LOAD należy zweryfikować na dużo większej grupie badanej.

Przedstawiony powyżej związek podhaplogrupy H5 i *APOE4* z ryzykiem LOAD wskazuje na zasadność uwzględniania w badaniach związku pomiędzy haplogrupami czy podhaplogrupami mitochondrialnymi a statusem *APOE4*. Nietrudno dostrzec znaczenie praktyczne poznania interakcji pomiędzy tymi czynnikami, na przykład w farmakoterapii. Zrozumienie związku pomiędzy *APOE4* i innymi czynnikami ryzyka może zwiększyć obiektywność prób klinicznych nowych leków, poprzez uwzględnienie i kontrolowanie podłoża genetycznego osób uczestniczących w badaniach. Dla

przykładu, wykazano, że osoby *APOE4+* nie odpowiadają na terapię z udziałem rozyglitazonu<sup>12</sup>, w odróżnieniu od chorych *APOE4-* (Risner i wsp., 2006). Ponadto, przyjmuje się, że haplogrupa H (w porównaniu z pozostałymi haplogrupami) związana jest z wyższą aktywnością metaboliczną mitochondriów, co może być istotnym, choć dotąd pomijanym, elementem planowania leczenia farmakologicznego AD. Podobne zależności opisano dla niektórych innych schorzeń neurologicznych, na przykład, wykazano, że cierpiący na migrenę nosiciele haplogrupy H - w odróżnieniu od nosicieli pozostałych haplogrup - nie odpowiadają na terapię ryboflawiną (Di Lorenzo i wsp., 2009). Można przypuszczać, że uwzględnienie nie tylko mitochondrialnej haplogrupy, ale także statusu *APOE4* pozwoli lepiej dobrać grupę pacjentów odpowiadających pozytywnie na leczenie farmakologiczne.

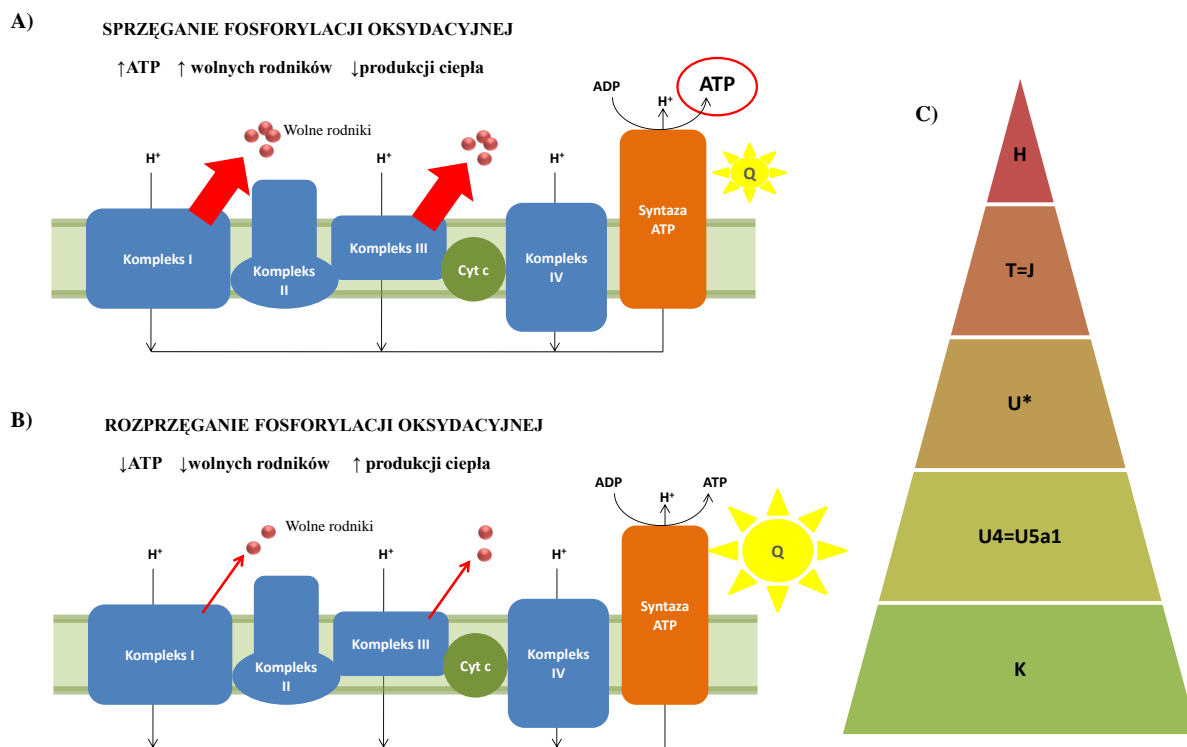
### 5.2.2 Haplogrupa H a sprzęganie/rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej

Uzyskane wyniki dotyczące związku haplogrupy H oraz klastera HV z ryzykiem LOAD potwierdzają hipotezę Wallace'a i wsp. (2003), którzy zaproponowali schemat udziału konkretnych haplogrup w etiopatogenezie chorób neurozwyrodnieniowych dzieląc je na związane ze sprzęganiem/rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej. Zasady tego podziału przedstawia Ryc. 37. Haplogrupy związane ze sprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej, w tym haplogrupa H, są z jednej strony powiązane z większą produkcją ATP, ale jednocześnie ze zwiększoną produkcją wolnych rodników, co prowadzi do stresu oksydacyjnego (Wallace i wsp. 2003; Wallace, 2005; Ruiz-Pesini i wsp., 2000). Ponieważ wzrost stresu oksydacyjnego wiąże się z wyższym ryzykiem chorób neurozwyrodnieniowych, nosiciele haplogrup związanych z fenotypem sprzęgania fosforylacji oksydacyjnej mają być tym samym bardziej narażeni na rozwój wspomnianej klasy chorób.

Zatem uzyskany wynik, dotyczący roli haplogrupy H w ryzyku LOAD jest spójny z założeniami hipotezy o niekorzystnym oddziaływaniu haplogrup związanych z fenotypem sprzęgania fosforylacji oksydacyjnej. Dotychczas pojawiały się doniesienia wykazujące pośrednio słuszność tego założenia. Wykazano na przykład, że nosiciele haplogrupy H charakteryzuje wyższy maksymalny pobór tlenu ( $VO_2$  max) oraz większe uszkodzenia oksydacyjne w porównaniu z nosicielami haplogrupy J (Marcuello i wsp., 2009; Martinez-Redondo i wsp., 2010). Nasuwa się zatem pytanie, dlaczego nosicielstwo haplogrupy H nie podlegało selekcji negatywnej w ewolucji? Wiadomo, że szkodliwe mutacje mtDNA są bardzo szybko eliminowane z żeńskich komórek linii płciowej, dzięki czemu większość mutacji chorobotwórczych w mtDNA utrzymuje się w populacji tylko przez kilka pokoleń (Gómez-Durán i wsp., 2010). Częstość mutacji o niewielkim efekcie fenotypowym zależy w populacji nie tylko od wpływu na jej fitness (dostosowanie darwinowskie), ale też od dryfu genetycznego i innych zjawisk stochastycznych (Ruiz-Pesini i wsp., 2004). Okazuje się, że haplogrupa H może być korzystna dla funkcjonowania niektórych tkanek – np. mózgu - zapewniając im poprzez sprzęganie fosforylacji oksydacyjnej większą ilość ATP (Wallace, 2005; Arning i wsp., 2010).

<sup>12</sup> agonista receptora aktywowanego przez proliferatory peroksisomów typu  $\gamma$  (*PPAR- $\gamma$* , *peroxisome proliferator-activated receptor*).

Ponadto, niewykluczone, że wysoka częstość względnie młodej filogenetycznie haplogrupy H w populacji europejskiej jest wynikiem pozytywnej selekcji naturalnej. Do ekspansji haplogrupy H mogło dojść np. w trakcie epidemii chorób, poprzez jej wpływ np. na równowagę energetyczną (Arning i wsp., 2010). Wydaje się też, że współcześnie fenotyp mitochondrialny związany z haplogrupą H może być korzystny w warunkach krótkotrwanie zaburzonej fosforylacji oksydacyjnej, na przykład w przebiegu udaru (Rosa i wsp., 2008) czy zakażenia septycznego (Baudouin i wsp., 2005), natomiast szkodliwe w przypadku chronicznych chorób, takich jak choroby neurozwyrodnieniowe (Brand, 2000).



**Ryc. 37. Schematyczne przedstawienie konsekwencji sprzęgania (A) i częściowego rozprzęgania (B) fosforylacji oksydacyjnej oraz hierarchii haplogrup powiązanych z fenotypem sprzęgania (góra piramidy) i częściowego rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej (C) (na podstawie Wallace i wsp., 2003).**

A) Sprzęganie fosforylacji oksydacyjnej to zamiana równoważników redukcyjnych na energię magazynowaną w ATP w łańcuchu oddechowym. Powstaje ATP, wolne rodniki i uwalniana jest mała ilość ciepła (Q). B) Rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej jest rezultatem przecieku protonów do matriks mitochondrialnej, następuje rozproszenie siły protomotorycznej, mniej protonów płynie przez syntazę ATP, co prowadzi do spadku ilości powstającego ATP i wytwarzanych wolnych rodników. Energia z utleniania substratów zostaje niespożytkowana i uwolniona w postaci ciepła. C) Uszeregowanie haplogrup specyficznych dla populacji kaukaskiej od tych o charakterze najbardziej sprzęgającym (na samej górze piramidy, haplogrupa H) do tych związanych z największym rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej (na samym dole piramidy, haplogrupa K). Symbolem U\* oznaczono wszystkie pozostałe podhaplogrupy U poza U4 i U5a1.

Przedstawione w rozprawie wyniki są zgodne również z drugą częścią hipotezy Wallace i wsp. (2003), dotyczącą protekcyjnej roli haplogrup i podhaplogrup (U4, U5a1, K, J1c, J2, T) wiązanych z częściowym rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej. Zaobserwowano związek haplogrup i podhaplogrup wiązanych z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej z niższym ryzykiem zachorowania na LOAD. Z uwagi na niską częstość pojedynczych haplogrup i podhaplogrup



wiązanych z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej, rozpatrując je osobno można nie uchwycić ich znaczenia dla ryzyka LOAD. Dlatego zbadano związek haplogrup z ryzykiem zachorowania na LOAD poprzez stopniowe dodawanie kolejnych haplogrup – najpierw U4, U5a1, K z klastera KU, następnie dodając haplogrupę J, i w końcu haplogrupę T, podobnie jak to uczynili Khusnutdinova i wsp. (2008). W ten sposób wykazano, że w całej grupie badanej zagregowane haplogrupy i podhaplogrupy związane z częściowym rozprzęgnięciem fosforylacji oksydacyjnej (U4+U5a1+K+J+T) są istotnie statystycznie związane z mniejszym ryzykiem zachorowania na LOAD. Dodatkowo, stwierdzono, że płeć jest istotnym statystycznie czynnikiem modulującym związek haplogrup J, T, K i U oraz ich klasterów, JT, KU z ryzykiem LOAD.

Analizując rolę zagregowanych podhaplogrup i haplogrup w grupie kobiet stwierdza się wyraźny wpływ haplogrupy T. Włączenie jej do zagregowanych haplogrup i podhaplogrup o potencjalnej roli w rozprzęgnięciu fosforylacji oksydacyjnej wpływa na obniżenie ryzyka LOAD. Uzyskane wyniki wskazują wyraźnie, że w grupie kobiet haplogrupa T osobno oraz klaster JT, złożony z filogenetycznie spokrewnionych haplogrup J i T, są czynnikiem zmniejszającym ryzyko zachorowania na LOAD. Ponadto, jeden z polimorfizmów definiujących haplogrupę T, m.13368G>A, jest także istotnie statystycznie rzadszy w grupie kobiet z LOAD, w porównaniu z kobietami z grupy kontrolnej.

Otrzymany efekt jest zależny od płci, gdyż w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla grupy kobiet, w grupie mężczyzn haplogrupa T nie wpływa istotnie na ryzyko LOAD. Słabym czynnikiem protekcyjnym w grupie mężczyzn jest klaster KU (OR=0,46). Należąca do wspomnianego klastera haplogrupa K stanowi bardzo słaby, na poziomie trendu statystycznego, czynnik protekcyjny, związany z niższym ryzykiem LOAD. Dodatkowo, wykazano wpływ haplogrupy K, neutralizujący ryzyko LOAD związane z posiadaniem przynajmniej jednego allelu *APOE4* (OR=0,18). Podobny wynik uzyskała grupa Carrieri i wsp. (2001) w populacji włoskiej.

Być może rzeczywistym czynnikiem protekcyjnym wobec LOAD jest polimorfizm m.9055G>A (definiujący haplogrupę K), powodujący niesynonimiczne podstawienie w genie podjednostki ATP6. Polimorfizm ten zidentyfikowano jako silny czynnik genetyczny zmniejszający ryzyko LOAD w całej grupie badanej i osobno w grupie mężczyzn. Efekt ten jest zgodny z hipotezą o protekcyjnej roli haplogrup związanych z fenotypem rozprzęgającym.

Ponadto, Hendrickson i wsp. (2008) stwierdzili, że wśród haplogrup populacji kaukaskiej klaster UK i U są najbardziej związane z niewydolnością energetyczną. Sugestię tę potwierdzono dla analizowanych w rozprawie grup badanych, stwierdzając, że podhaplogrupa U, U5a1 jest istotnie statystycznie powiązana z ok. dwukrotnie niższym ryzykiem zachorowania na LOAD (OR=0,41). Ponadto, wykryto, że haplogrupa U jest na granicy istotności statystycznej związana z dwukrotnie niższym ryzykiem zachorowania na LOAD w grupie stuletek.

Za wpływem zmian w mtDNA na fenotyp sprzęgania/rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej przemawiają również badania *in vitro*. Gómez-Durán i wsp. (2010) wykazali, że cybrydy z mtDNA należącym do klastera KU mają niższą ilość kopii mtDNA, niższy poziom mitochondrialnych rRNA

---

oraz przejawiają rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej w porównaniu z cybrydami z mtDNA należącymi do haplogrupy H. Te dwa rodzaje cybryd różnią jedynie dwa niesynonimiczne polimorfizmy w mitochondrialnych genach podjednostek kompleksów oddechowych, m.14766C>T (Thr7Ile - definiujący klaster HV), oraz m.14798T>C (Phe18Leu – obecny w klasterze KU) w genie podjednostki mitochondrialnej CYTB. Badania wskazują, że m.14766C>T wpływa na wydajność cyklu Q (Beckstead i wsp., 2009).

Niewykluczone, że polimorfizm m.14766C>T odpowiada za opisaną wyżej asocjację haplogrupy H i klastera HV z ryzykiem LOAD. Badania nad konplastycznymi szczepami myszy i szczurów, charakteryzującymi się identycznym genomem jądrowym, ale innym mtDNA, wskazują, że zmienność mtDNA wpływa na różnice w fosforylacji oksydacyjnej, co ma przełożenie na konkretne cechy fenotypowe, w tym funkcje poznawcze (Roubertoux i wsp., 2003; Yu i wsp., 2009). Wpływ haplogrup mitochondrialnych może być bezpośredni, poprzez modyfikowanie wydajności fosforylacji oksydacyjnej albo pośredni, poprzez interakcje z genami jądrowymi na poziomie genomu lub proteomu (Baudouin i wsp., 2005). Dla haplogrup mtDNA postuluje się istnienie specyficznej i odrębnej wartości progowej wydajności fosforylacji oksydacyjnej, której przekroczenie sprzyja dysfunkcji metabolizmu, i w konsekwencji - zapadalności na choroby z tym związane (Gómez-Durán i wsp., 2010). Gómez-Durán i wsp. (2010) założyli, że przynależność do określonej haplogrupy wywiera niewielki wpływ na wydajność fosforylacji oksydacyjnej, ale w kontekście innych współobecnych czynników rodzaj posiadanej haplogrupy może być krytyczny. Tłumaczy to zarazem względnie niskie wartości ilorazu szans uzyskiwanego dla roli haplogrup i klasterów, także w opisanych w niniejszej pracy badaniach, a także opisaną wyżej interakcję pomiędzy podhaplogrupą H5 a allelem *APOE4*.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na wyraźną protekcyjną rolę haplogrup wiązanych z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej wobec AD. Warto zaznaczyć, że jest to pierwsza pozytywna weryfikacja hipotezy Wallace i wsp. (2003) dotycząca choroby Alzheimera. Protekcyjną rolę haplogrup wiązanych z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej stwierdzono dotychczas również w innej chorobie neurozwyrodnieniowej – chorobie Parkinsona (Gawęda-Walerych i wsp., 2008; Khusnutdinova i wsp., 2008). Wskazuje to, że rodzaj posiadanej haplogrupy mitochondrialnej jest istotnym czynnikiem modyfikującym ryzyko chorób neurozwyrodnieniowych.

Chociaż w przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono różnic w wieku wystąpienia pierwszych objawów wczesnej i późnej postaci AD w zależności od posiadanej haplogrupy mitochondrialnej, u osób z rozpoznaniem MCI zaobserwowano istotny związek pomiędzy posiadaniem haplogrupy H (wiązanej ze sprzężaniem fosforylacji oksydacyjnej) a niższym wiekiem konwersji do LOAD w porównaniu do osób z haplogrupą U (wiązanej z fenotypem rozprzęgającym). Co ciekawe, w chorobie Huntingtona także obserwuje się związek nosicielstwa haplogrupy H z wcześniejszym wystąpieniem objawów (Arning i wsp., 2010). Zidentyfikowanie związku pomiędzy posiadaną haplogrupą mitochondrialną a wiekiem konwersji z MCI do LOAD być może wiąże się z tym, że ta grupa osób (z rozpoznaniem MCI) była dokładnie obserwowana przez ok. 6 lat i

precyzyjniej można było określić u nich wiek rozwinięcia LOAD. W grupie chorych z LOAD informację o wieku pojawienia się pierwszych objawów zwykle uzyskuje się od rodziny i może być ona obciążona istotnym błędem. Mogło to wpłynąć na uzyskany wynik braku związku haplogrup mitochondrialnych z wiekiem wystąpienia objawów choroby w grupie LOAD.

Uzyskane wyniki nie zgadzają się z hipotezą Wallace i wsp. (2003) w jednym aspekcie. Autorzy hipotezy postulują, że haplogrupy związane z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej sprzyjają długowieczności (Brand, 2000; Wallace, 2005). Niewykluczone, że autorów tej hipotezy urzekła koncepcja tzw. pomyślnego starzenia się (*successful ageing*, termin wprowadzony przez Rowe i Khan w 1987) i nie uwzględnili w swoim założeniu, że większość stulatków cierpi na choroby, którym autorzy hipotezy przypisują tzw. haplogrupy sprzęgające jako czynnik ryzyka. W przeciwieństwie do stulatków mieszkających na północy Włoch (De Benedictis i wsp., 1999) oraz w Finlandii (Niemi i wsp., 2003), haplogrupa J w badanej grupie nie sprzyja długowieczności, podobnie jak w grupie Żydów Aszkenazyjskich (Shlush i wsp., 2008), w populacji francuskiej (Ivanova i wsp., 1998) oraz zamieszkującej Włochy południowe (Dato i wsp., 2004). Niewykluczone, że wpływ haplogrupy J na długowieczność zależy od oddziaływań epistatycznych z genami jądrowymi bądź czynnikami środowiskowymi, nieobecnymi w pozostałych populacjach. Długowieczność, jak wynika z badań epidemiologicznych, wydaje się być powiązana z dziedziczeniem matczynym (Korpelainen, 1999), jednak nie wykryto mitochondrialnej haplogrupy związanej z większym prawdopodobieństwem osiągnięcia długowieczności.

### 5.3 Zmienność sekwencji regionu kontrolnego mtDNA u chorych z LOAD

Schodząc w analizie mtDNA o poziom niższy niż haplogrupy i ich podtypy, badano zmienność regionu kontrolnego (RK). W obrębie sekwencji RK zidentyfikowano allele związane ze zmniejszeniem ryzyka LOAD (m.16224C, m.242T, m.497T). Ponieważ są to polimorfizmy stosowane do definiowania haplogrup i podhaplogrup wiązanych z fenotypem częściowego rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej, ich wpływ na funkcjonowanie mitochondriów, fizjologię komórki, i pośrednio na cały organizm, należy rozpatrywać na tle pozostałych zmian sekwencji mtDNA oraz badanych sekwencji jądrowego DNA. Allel m.242T jest jednym z markerów definiujących podhaplogrupę J1b1, m.16224C - haplogrupę K, a m.497T – podhaplogrupę K1a. Polimorfizm m.16224T>C znajduje się w regionie 7SDNA, natomiast m.242C>T jest zlokalizowany w miejscu początku startu replikacji nici H oraz w miejscu przyłączenia się mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego (TFAM). Ich lokalizacja w ważnych dla mtDNA regionach funkcjonalnych sugeruje, że mogą one wpływać na ekspresję genomu mitochondrialnego. Z drugiej strony, mogą stanowić jedynie markery właściwych zmian przyczynowych mtDNA, a ich protekcyjna rola może wynikać z przynależności do haplogrup omówionych w rozdziale 5.2.2 Dyskusji.

Poza polimorfizmami potencjalnie protekcyjnymi, zidentyfikowano warianty mtDNA związane z wzrostem ryzyka LOAD, w tym marker haplogrupy U3, m.16343G. Wspomniany

---

polimorfizm znaleziono jedynie w grupie chorych z LOAD i z uwagi na niską liczbę nosicieli trudno rozstrzygać o jego znaczeniu.

Analiza sekwencji RK w grupie stulatków z rozpoznaniem LOAD w porównaniu z grupą kontrolną, wykazała, że allel m.16126C jest czynnikiem protekcyjnym, natomiast allel m.16183C wiąże się z ryzykiem LOAD we wspomnianej grupie wiekowej. Warto zaznaczyć, że w analizie wieloczynnikowej przeprowadzonej w grupie 422 chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną zaobserwowano trend statystyczny wskazujący na protekcyjną rolę allelu m.16126C.

Oba polimorfizmy mogą mieć znaczenie funkcjonalne. Polimorfizm m.16126C>T definiuje klaster JT, natomiast allel m.16183C jest powiązany z występowaniem heteroplazmii długości w regionie 16183-16193pz, która z kolei jest wiązana z niestabilnością genomu mitochondrialnego (Zhao i wsp., 2010). Jednak w grupie stulatków, będących nosicielami m.16183C, nie stwierdzono w mtDNA w leukocytach krwi obwodowej nowych wariantów homo- i heteroplazmatycznych obejmujących RK mtDNA. Niewykluczone jednak, że mogło dojść do mutacji poza RK, ponadto w mózgu tych osób wspomniana zmiana może być powiązana z wyższą częstością mutacji somatycznych niż wynikającą z zaawansowanego wieku.

W RK mtDNA zidentyfikowano dziewięć nowych homoplazmatycznych wariantów w grupie LOAD oraz trzy w grupie kontrolnej. Jedenaście z nich znajduje się w regionach o znaczeniu funkcjonalnym, jak np. miejsce startu replikacji nici ciężkiej. Wystąpiły one na tle różnych haplogrup, stąd nie można na tej podstawie wnioskować o związku którejkolwiek z haplogrup z wyższą częstością powstawania zmian w RK. Zidentyfikowane warianty, nieopisane dotąd w literaturze i bazach danych, są najprawdopodobniej rzadkimi polimorfizmami. Trudno jednak, nie określwszy pełnej sekwencji mtDNA ani nie znając wpływu wariantów mtDNA na ekspresję genów mitochondrialnych, wnioskować o wywieranym przez nie efekcie fenotypowym. Potencjalny wpływ mutacji w mtDNA może zależeć od sekwencji całego mtDNA, w tym od obecności innych zmian albo konkretnej haplogrupy, w tle której występują.

W grupie EOAD nie stwierdzono różnic w częstości polimorfizmów RK ani nowych wariantów w porównaniu z grupą kontrolną. Brak związku zmienności mtDNA z ryzykiem EOAD może wynikać z niskiej liczebności tej grupy, bądź, jak niektórzy postulują, innej pozycji dysfunkcji mitochondriów w sekwencji zdarzeń prowadzącej do charakterystycznej dla EOAD neuropatologii (Swerdlow i Khan, 2004).

### **5.3.1 Występowanie zmian heteroplazmatycznych w regionie kontrolnym w badanych grupach**

We wszystkich badanych grupach zaobserwowano zmiany heteroplazmatyczne, jednak ich częstość i pozycje, których dotyczyły nie różniły się istotnie pomiędzy grupą kontrolną a badanymi (grupa LOAD, EOAD, stulatkowie z LOAD). Częstość występowania heteroplazmii nie odbiega znacząco od odnotowanej w literaturze (Santos i wsp., 2008; Irwin i wsp., 2009). Jednak dokładne oszacowanie rodzajów i częstości zmian heteroplazmatycznych nie było celem niniejszej pracy z

uwagi na różnice, jakie mogą zaistnieć pomiędzy zmianami analizowanymi we krwi i w mózgu, gdzie poziom mutacji somatycznych, heteroplazmatycznych może być znacznie wyższy (Jazin i wsp., 1996). Ponadto wiadomo że, częstość heteroplazmii rośnie z wiekiem (Jazin i wsp., 1996; Coskun i wsp. 2004). Trudno zatem na podstawie wyników sekwencjonowania RK mtDNA z leukocytów krwi obwodowej wnioskować o roli zmian somatycznych w innych tkankach, a zwłaszcza w mózgu.

## 5.4 Analiza roli zmienności wybranych genów jądrowych w AD

Dysfunkcja mitochondriów w chorobie Alzheimera może być uzależniona od zmian w sekwencji genów jądrowych i/lub ich interakcji z wariantami mtDNA. W niniejszej pracy poddano analizie wybrane polimorfizmy genów odpowiedzialnych za biogenezę mitochondriów (*TFAM* i *PGC-1 $\alpha$* ), homeostazę żelaza (*HFE*), oraz zmiany konformacyjne białek istotnych dla procesów apoptozy oraz funkcji A $\beta$ PP i tau (*PINI*).

### 5.4.1 Rola polimorfizmów rs1937 i rs2306604 *TFAM*

Przeprowadzono analizę dwóch polimorfizmów, rs1937 oraz rs2306604, genu *TFAM*, stanowiącego jeden z nadrzędnych regulatorów biogenezy mitochondriów i powielania mtDNA. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstościach alleli i genotypów polimorfizmu rs1937 pomiędzy grupą LOAD, EOAD i grupą kontrolną. Związek genotypu GG polimorfizmu rs1937 z ryzykiem LOAD, postulowany przez Alvarez i wsp. (2008) oraz Günther i wsp. (2004), uwidocznił się dopiero po uwzględnieniu statusu *APOE4* badanych, tak, że jedynie u osób *APOE4*<sup>+</sup> genotyp GG rs1937 jest istotnie statystycznie związany z wyższym ryzykiem zachorowania (Alvarez i wsp., 2008; Günther i wsp., 2004; Belin i wsp., 2007). Zebrane w pracy wyniki wskazują również na występowanie synergistycznej interakcji pomiędzy allelem *APOE4* a genotypem GG rs1937. W analizie MDR interakcja tych zmiennych została uznana za najlepszy model spośród badanych kombinacji zmiennych. Włączenie do analizy MDR polimorfizmów RK mtDNA zaowocowało wyodrębnieniem najlepszego modelu złożonego z oddziaływań pomiędzy statusem *APOE4*, rs1937 oraz m.497C>T, jednak istotnym czynnikiem ryzyka LOAD pozostaje interakcja *APOE4* x rs1937, natomiast polimorfizm m.497C>T, wchodzący w skład podhaplogrupy K1a, jest czynnikiem protekcyjnym. Program MDR, który identyfikuje nieliniowe interakcje, wyodrębnił podhaplogrupę K1a jako czynnik protekcyjny, niewykryty w innych analizach prowadzonych na grupie badanej. Co ciekawe, podhaplogrupa K1a jest czynnikiem zmniejszającym ryzyko choroby Parkinsona w polskiej populacji (Gawęda-Walerych i wsp., 2008).

Zaobserwowany związek genotypu GG polimorfizmu rs1937 wraz z nosicielstwem *APOE4* z ryzykiem LOAD pozostaje niejasny. Polimorfizm rs1937 (Ser12Thr) nie jest bowiem konserwowany ewolucyjnie (Alvarez i wsp., 2008). Ponadto, oba warianty polimorfizmu rs1937 mają podobne właściwości – zbliżoną polarność, punkt izoelektryczny, natomiast różni je jedynie stosunek objętości łańcucha bocznego do długości aminokwasu (Higgs i Attwood, 2008). Niewykluczone więc, że

---

wspomniany polimorfizm jest jedynie markerem zmiany wpływającej na fenotyp, z którą jest sprzężony.

Analiza drugiego polimorfizmu *TFAM*, rs2306604, pokazała, że genotyp GG jest związany z ryzykiem zachorowania na EOAD i LOAD. Allel G jest związany ze zwiększonym ryzykiem LOAD na granicy istotności statystycznej w całej grupie badanej, także w grupie kobiet oraz jest istotnie związany z ryzykiem EOAD. Jest to sprzeczne z wynikami Belin i wsp. (2007), którzy łączą allel A z zachorowaniem na AD. W badanych grupach wykazano, że wpływ genotypu GG może się ujawnić tylko wtedy, kiedy nieobecny jest udział silnego czynnika ryzyka, *APOE4*.

Polimorfizmy rs1937 oraz rs2306604 znajdują się w całkowitej nierównowadze sprzężeń ( $D'=1$ ). W odróżnieniu od Belin i wsp. (2007) i Günther i wsp. (2004) nie stwierdzono, by haplotyp  $G_{rs1937}A_{2306604}$  był istotnie częstszy w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Przeciwnie, przeważał w grupie kontrolnej, także po stratyfikacji badanych ze względu na płeć. Drugi co do częstości haplotyp,  $G_{rs1937}G_{2306604}$  jest istotnie statystycznie częstszy w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną ( $p=0,023$ ). W świetle uzyskanych wyników, u nosicieli  $G_{rs1937}G_{2306604}$  oraz przynajmniej jednego allelu *APOE4* na wzrost ryzyka zachorowania będzie miał wpływ genotyp GG rs1937. Jednocześnie, wpływ genotypu rs2306604 będzie nieistotny. Natomiast u nosicieli  $G_{rs1937}G_{2306604}$  o statusie *APOE4*- wpływ na ryzyko zachorowania będzie mieć genotyp GG rs2306604. Dodatkowo, podobnie jak w badaniach opisanych przez Alvarez i wsp. (2008) nie stwierdzono wpływu genotypów polimorfizmów rs1937 oraz rs2306604 *TFAM* na wiek zachorowania na AD.

Badania nad zmianami epigenetycznymi w AD wskazują, że jednym z najbardziej modyfikowanych genów w mózgu i limfocytach krwi obwodowej chorych jest *TFAM* (Wang i wsp., 2008a). Dlatego możliwe jest, że zidentyfikowane w przedstawionych badaniach asocjacyjnych polimorfizmy rs1937 oraz rs2306604 *TFAM* wraz ze zmianami w metylacji tego genu przyczyniają się do powstania AD. Niewykluczone także, że stwierdzana u chorych na AD zmniejszona liczba kopii mtDNA jest wynikiem zmniejszenia poziomu ekspresji *TFAM* i obecności wariantów splicingowych (Coskun i wsp., 2010), na co nakłada się dodatkowo wpływ *APOE4*.

#### **5.4.2 Rola polimorfizmu Gly482Ser (rs8192678) *PGC-1 $\alpha$***

*PGC-1 $\alpha$*  jest nadrzędnym regulatorem równowagi energetycznej komórki, stąd interesującym wydawało się zbadanie roli polimorfizmu Gly482Ser, którego allele wiązane są z przeciwstawnymi funkcjami w metabolizmie. Wykazano, że nosicielstwo przynajmniej jednego allelu 482Ser wiąże się z ok. dwukrotnym wzrostem ryzyka LOAD, ale jedynie u osób o statusie *APOE4*-. Zidentyfikowany związek allelu 482Ser z AD w grupie osób o statusie *APOE4*- może świadczyć o tym, że efekt *PGC-1 $\alpha$*  jest maskowany przez *APOE4* i jego oddziaływanie jest słabsze.

W grupie mężczyzn stwierdzono, że homozygotyczność pod względem allelu 482Ser zmniejsza ryzyko LOAD, jednak uzyskany wynik może być powiązany z brakiem zachowania równowagi Hardy'ego i Weinberga dla badanego polimorfizmu *PGC-1 $\alpha$*  w grupie chorych na LOAD mężczyzn.

Poza opisywanymi w niniejszej rozprawie wynikami dotyczącymi roli Gly482Ser w AD, dotychczas przeprowadzono jedno badanie dotyczące roli tego polimorfizmu i nie wykazało ono asocjacji Gly482Ser z ryzykiem AD (Helisalmi i wsp., 2008). Wielkość wykorzystanej przez Helisalmi i wsp. (2008) grupy była porównywalna z opisaną w niniejszej rozprawie, ale nie zbadali oni interakcji pomiędzy nosicielstwem allelu *APOE4* i Gly482Ser ani wpływu Gly482Ser na konwersję z MCI do LOAD.

W niniejszej pracy stwierdzono, że polimorfizm Gly482Ser jest związany z wyższym prawdopodobieństwem rozwinięcia LOAD u osób w stadium MCI. Wynik ten uzyskano w całej grupie oraz osobno w grupie kobiet. Allel 482Ser jest powiązany z dwukrotnie wyższym ryzykiem konwersji do LOAD u osób z diagnozą MCI, niezależnie od genotypu *APOE*. Ponadto, na tle pozostałych czynników ryzyka LOAD 482Ser istotnie zwiększa prawdopodobieństwo rozwinięcia LOAD u osób z MCI.

Analiza bioinformatyczna sekwencji zawierającej allel C lub T polimorfizmu c.1444C>T (Gly482Ser) pokazała, że allel T może potencjalnie wpływać na splicing *PGC-1α*. Badania *in vitro* nad *Pgc-1α* świni wykazały istnienie dwóch alternatywnych transkryptów, pozbawionych całego eksonu 8 (w którym znajduje się c.1444C>T) lub bardzo dużej jego części (Erkens i wsp., 2008). Istnienie alternatywnych transkryptów stwierdzono także w ludzkiej nerce i wątrobie (Erkens i wsp., 2008). Ich obecność także w mózgu, choć dotąd niezbadana, mogłaby wpływać na regulację kolejnych czynników transkrypcyjnych niezbędnych do aktywacji ekspresji TFAM oraz innych genów, w których regulację *PGC-1α* jest zaangażowane. Istotnie, Deeb i Brunzell (2009) donoszą, że *PGC-1α* z wariantem 482Ser jest mniej wydajnym koaktywatorem czynników transkrypcyjnych.

Dotychczas, 482Ser został powiązany z ryzykiem cukrzycy typu II (Ek i wsp., 2001) oraz nadciśnienia (Vimalaswaran i wsp., 2008), które jednocześnie stanowią czynniki ryzyka AD. Ponadto, stwierdzono, że wraz z wiekiem u nosicieli 482Ser poziom *PGC-1α* ulega obniżeniu (Ling i wsp., 2004). Zaobserwowano, że 482Ser występuje rzadziej u sportowców uprawiających sporty wytrzymałościowe (Eynon i wsp., 2010; Lucia i wsp., 2005). Wydaje się więc, że dwa warianty polimorfizmu Gly482Ser znajdują się na dwóch biegunach fenotypowych. Stąd 482Ser jest związany z zaburzeniami metabolizmu i może stanowić mniej efektywny koaktywator czynników transkrypcyjnych, wraz z tymi, które regulują ekspresję samego *PGC-1α*. Niższy poziom *PGC-1α* może prowadzić do obniżenia poziomu metabolizmu. Wskazuje to na potencjalny cel terapeutyczny w AD.

### 5.4.3 Rola polimorfizmów His63Asp oraz Cys282Tyr *HFE*

W przebiegu AD obserwuje się zaburzoną homeostazę żelaza, jednak badane allele i genotypy polimorfizmów His63Asp oraz Cys282Tyr *HFE* okazały się niezwiązane w badanej grupie z ryzykiem zachorowania. Nie potwierdzono postulowanego związku polimorfizmu His63Asp z wcześniejszym wystąpieniem objawów AD (Sampietro i wsp., 2001; Alizadeh i wsp., 2009; Correia i wsp., 2009), co jest z kolei zgodne z wynikami opublikowanymi przez trzy inne grupy badawcze (Candore i wsp.,

---

2003; Blázquez i wsp., 2007; Berlin i wsp., 2004). Zaobserwowano natomiast istotny statystycznie związek nosicielstwa przynajmniej jednego allelu G845A (Cys282Tyr) ze zwiększonym ryzykiem konwersji z MCI do LOAD. Niewykluczone, że jest to rezultatem statystycznego oddziaływania wspomnianego allelu na wczesnych etapach rozwoju LOAD. W okresie klinicznie bezobjawowym lub na wczesnym stadium choroby wyższy poziom żelaza prowadzi m.in. do wzrostu stresu oksydacyjnego. Istotnie, u osób z MCI obserwowano wyższy poziom żelaza w mózgu i stres oksydacyjny (Smith i wsp., 2010).

Niedawno pojawiły się doniesienia świadczące o roli polimorfizmu His63Asp w tworzeniu ryzyka LOAD dopiero w interakcji z polimorfizmem w genie transferyny (Lehmann i wsp., 2010). Autorzy postulują, że mimo braku efektów głównych obu polimorfizmów, ich interakcja jest istotna dla zachorowania (Lehmann i wsp., 2010). W niniejszej pracy nie badano zmienności genu transferyny, natomiast sprawdzono interakcje polimorfizmów His63Asp i Cys282Tyr z pozostałymi badanymi czynnikami. Nie potwierdzono jednak występowania interakcji pomiędzy wariantami *HFE* a polimorfizmami mtDNA, haplogrupami mitochondrialnymi i polimorfizmami w pozostałych badanych genach jądrowych w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

Niedawno wykazano, że nosicielstwo wariantu His63Asp jest związane z 30% wzrostem poziomu ufosforylowanych cząsteczek PIN1, co może oznaczać jego spadek aktywności (Hall i wsp., 2010). Jakie konsekwencje może mieć stwierdzona istotna interakcja o charakterze synergii między His63Asp *HFE* i rs2010457 *PIN1* w grupie EOAD pozostaje jednak niejasne.

#### **5.4.4 Rola zmienności *PIN1***

Uzyskane wyniki nie wskazują na udział polimorfizmów genu *PIN1* w LOAD, co jest spójne z wynikami badań z innych populacji (Poli i wsp., 2005; Lambert i wsp., 2006; Nowotny i wsp., 2007). Nie stwierdzono różnic w częstościach badanych alleli i genotypów polimorfizmów *PIN1*, a także tworzonych przez nie haplotypów pomiędzy grupą chorych na EOAD, LOAD a grupą kontrolną. Nie potwierdzono asocjacji polimorfizmu rs2233678 (-842G>C) oraz haplotypu -842C/-667C (rs2233682) ze zwiększonym ryzykiem AD, jak otrzymano w populacji z północnych Włoch (Segat i wsp., 2007).

Analiza sekwencji *PIN1* wraz z jego regionem promotorowym doprowadziła do zidentyfikowania czterech nowych wariantów genu (g.9805833T>C; c.24G>T, c.58+64C>T, c.382+105C>T), będących jednonukleotydowymi podstawieniami, nieobecnymi w grupie kontrolnej. U dwóch chorych z LOAD wykryto ten sam wariant, co u jednej osoby z EOAD, c.58+64C>T. Analiza bioinformatyczna sugeruje potencjalny wpływ g.9805833T>C; c.24G>T oraz c.58+64C>T na przyłączanie się czynników transkrypcyjnych, bądź na splicing. Lokalizacja wariantu c.382+105C>T oraz wyniki analizy *in silico* przemawiają za jego niepatogennością.

Możliwe było wykonanie analizy ekspresji *PIN1* na poziomie mRNA tylko u jednej z nosicieli zidentyfikowanych wariantów. W limfocytach krwi obwodowej stwierdzono u chorej nosicielki wariantu c.58+64C>T 2,82 razy niższą ekspresję *PIN1* w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej. Uzyskany wynik nie rozstrzyga jednak o poziomie *PIN1* w mózgu badanej chorej (Sultana



i wsp., 2006; Butterfield i wsp., 2006; Zhang i wsp., 2004). Ponadto, wśród nosicielek c.58+64C>T jedna chorowała na wczesnoobjawową rodzinną postać AD, a dwie na rodzinną późnoobjawową postać AD, co sugeruje, że zmiana ta może być tylko markerem innej, sprzężonej z nią mutacji, i/lub jej potencjalny wpływ na zachorowanie jest modyfikowany genotypem *APOE*. Nosicielka dwóch alleli *APOE4* zachorowała najwcześniej, w wieku 51 lat. Pozostałe dwie nosicielki miały tylko po jednym allelu *APOE4* i zachorowały odpowiednio w wieku 70 i 71 lat.

Żaden ze zidentyfikowanych wariantów nie był powiązany z wyjątkowo wczesnym wiekiem zachorowania oraz bardzo dynamicznym przebiegiem choroby. Stąd uzyskane wyniki sugerują, że zmiany w *PIN1* są związane z rodzinną postacią AD o wieku wystąpienia pierwszych objawów mieszczącym się w szerokim zakresie 45-75 lat.

*PIN1* jest jednym z białek ulegających utlenieniu zarówno w przebiegu MCI i AD, co zaburza jego fizjologiczne funkcje (Sultana i Butterfield, 2010). Obniżony poziom *PIN1* i/lub utlenienie mogą prowadzić do tworzenia się NFT oraz A $\beta$  (Sultana i Butterfield, 2010; Aluise i wsp., 2010). Niewykluczone, że na tle haplogrup rozprzegających metabolizm, związanych z produkcją większej ilości wolnych rodników dochodzi do częstszego utleniania *PIN1* i wzmożonego powstawania NFT oraz A $\beta$ . Analiza przeprowadzona za pomocą programu MDR nie potwierdziła jednak interakcji na poziomie genetycznym pomiędzy polimorfizmami *PIN1* i haplogrupami mitochondrialnymi.

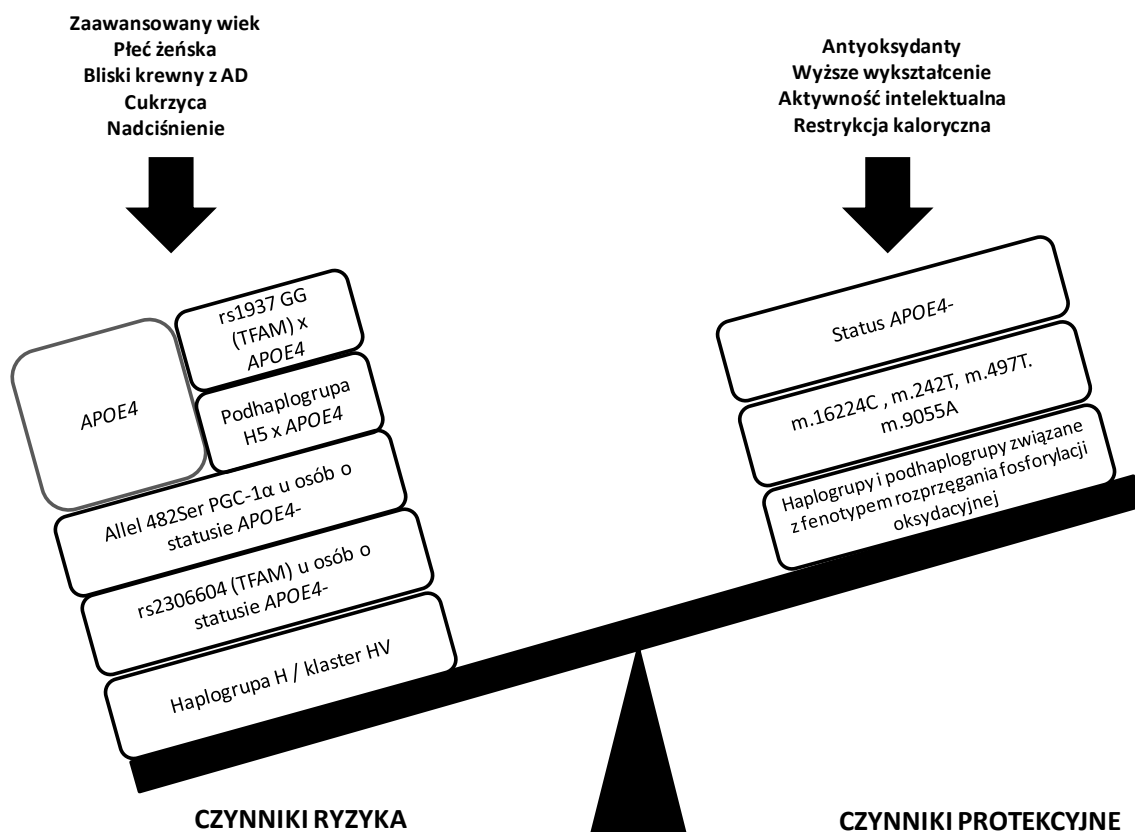
## 5.5 Krótkie podsumowanie wyników

*Niniejsza praca prezentuje zidentyfikowane czynniki ryzyka oraz czynniki protekcyjne choroby Alzheimera w różnych grupach wiekowych (<65 lat, >65 lat, 100 lat).*

*W grupie chorych w wieku <65 lat zidentyfikowano kilka nowych czynników ryzyka EOAD. Stwierdzono obecność nowych wariantów sekwencji genu *PIN1* oraz wykazano, że genotyp GG polimorfizmu rs2306604 *TFAM* jest związany z ryzykiem zachorowania na EOAD. Ponadto, stwierdzono interakcję pomiędzy polimorfizmem rs2010457 *PIN1* z rs1799945 *HFE*, zwiększającą ryzyko EOAD. Nie stwierdzono roli zmienności mtDNA w modyfikowaniu ryzyka EOAD.*

*W grupie stulatków wykazano, że czynnikiem zmniejszającym ryzyko LOAD jest polimorfizm mtDNA, m.16126C, natomiast czynnikiem ryzyka jest wariant m.16183C. Związek haplogrupy U z dwukrotnie niższym ryzykiem zachorowania na LOAD u stulatek jest na granicy istotności statystycznej. W grupie stulatków nie stwierdzono związku nosicielstwa klastera HV i haplogrupy H z zachorowaniem na LOAD. Allel *APOE4* nie jest czynnikiem ryzyka LOAD w grupie stulatków (OR=0,24). Dodatkowym rezultatem przeprowadzonych analiz jest stwierdzenie, że haplogrupa J jest istotnie rzadsza wśród stulatków, a przynależność do klastera TJ zmniejsza ok. dwukrotnie prawdopodobieństwo stulatką osiągnięcia długowieczności.*

*Poszukując czynników związanych z zapadalnością na LOAD, wykryto kilka istotnych statystycznie czynników ryzyka oraz czynników protekcyjnych, podsumowanych na Ryc. 38.*



**Ryc. 38. Podsumowanie stwierdzonych czynników ryzyka LOAD oraz czynników protekcyjnych w badaniach opisanych w rozprawie.** Lewa strona ryciny przedstawia czynniki ryzyka, prawa – czynniki protekcyjne. Poza wynikami opisanych w rozprawie badań przedstawiono także znane czynniki wpływające na ryzyko LOAD (oznaczone czarną strzałką). Brak równowagi pomiędzy czynnikami protekcyjnymi i czynnikami ryzyka wpływa na rozwój LOAD.

Wśród czynników związanych z obniżeniem ryzyka LOAD znajdują się polimorfizmy mitochondrialne (m.9055A, m.16224C, m.242T, m.497T) wchodzące w obręb haplogrup wiązanych z rozprężaniem fosforylacji oksydacyjnej, które w przeprowadzonych analizach także okazały się czynnikiem protekcyjnym. Ponadto stwierdzono, że haplogrupa K neutralizuje ryzyko związane z nosicielstwem allelu APOE4. W grupie kobiet czynnikiem protekcyjnym jest nosicielstwo klastera JT oraz haplogrupy T, natomiast w grupie mężczyzn przed zachorowaniem ma chronić nosicielstwo klastera KU. Uzyskane wyniki stanowią weryfikację hipotezy Wallace'a i wsp. (2003) o protekcyjnym wpływie haplogrup i podhaplogrup wiązanych z rozprężaniem fosforylacji oksydacyjnej (U4, U5a1, K, J, T), zmniejszających ryzyko chorób neurodegeneracyjnych – w tym przypadku LOAD.

Z drugiej strony, zidentyfikowano czynniki ryzyka rozwoju LOAD, wśród których znajduje się haplogrupa wiązana ze sprzężeniem fosforylacji oksydacyjnej, H, oraz klaster HV. Potwierdzono także rolę allelu APOE4 jako czynnika ryzyka zachorowania na LOAD. Uzyskano wyniki wskazujące, że interakcja pomiędzy podhaplogrupą H5 a statusem APOE4 powoduje znaczący wzrost ryzyka zachorowania na LOAD (OR=33,13) w porównaniu z wpływem samego nosicielstwa przynajmniej jednego allelu APOE4 (OR=5,12). Ponadto, relacja pomiędzy allelem APOE4 oraz genotypem GG

polimorfizmu rs1937 także ma charakter interakcji, która wywiera silniejszy wpływ na ryzyko zachorowania na LOAD niż sam status APOE4.

Stwierdzono, że u osób o statusie APOE4- genotyp GG polimorfizmu rs2306604 TFAM oraz nosicielstwo allelu 482Ser PGC-1 $\alpha$  jest związane z wyższym ryzykiem zachorowania na LOAD.

W grupie chorych z LOAD zidentyfikowano jeden nowy wariant w regionie promotorowym PIN1 (g.9805834T>C). Ponadto, u 2 chorych z LOAD wykryto wariant stwierdzony w grupie EOAD, c.58+64C>T. Ekspresja PIN1 u nosicielki substytucji c.58+64C>T była 2,82 razy niższa niż w grupie kontrolnej.

## 5.6 Oddziaływania epistatyczne między badanymi czynnikami

Coraz więcej badań wskazuje na rolę oddziaływań epistatycznych pomiędzy genomem mitochondrialnym i jądrowym w starzeniu oraz w chorobach mu towarzyszących (Tranah i wsp., 2010). Jednak pomimo zastosowania narzędzi bioinformatycznych służących do wykrywania interakcji nieliniowych, niewykazywanych za pomocą regresji logistycznej, wykryto tylko jedną istotną interakcję pomiędzy polimorfizmami w genach jądrowych i zmiennością mtDNA. Zidentyfikowano mianowicie oddziaływanie epistatyczne pomiędzy polimorfizmami m.497C>T, rs1937 (TFAM) oraz statusem APOE4. Uzyskane wyniki oddziaływań epistatycznych potwierdziły protekcyjną rolę haplogrupy K (m.497T jest markerem podhaplogrupy K1a) i wskazały na interakcję APOE4 z rs1937 w tworzeniu ryzyka LOAD. Genotypy i allele polimorfizmu rs1937 nie są samodzielnie związane z ryzykiem zachorowania na LOAD. Dopiero uwzględnienie statusu APOE4 pozwala dostrzec ich związek z ryzykiem LOAD. Powyższe dane wskazują dobitnie, jak istotne znaczenie ma rozpatrywanie badanych czynników nie pojedynczo, a w relacji do innych zmiennych, wpływających na ryzyko zachorowania. Uzasadniają także konieczność jednoczesnego badania zmienności genów jądrowych i mtDNA oraz wskazują celowość wykorzystywania kilku niezależnych metod do sprawdzania zależności między badanymi zmiennymi. Niezbędne są jednak dalsze badania, które potwierdzą uzyskane wyniki na większej liczbie badanych oraz zaproponują mechanizm oddziaływania pomiędzy produktami APOE4 i rs1937.

Jedną z zalet programu MDR jest możliwość zidentyfikowania interakcji o wysokiej sile, pomiędzy loci, które samodzielnie nie wywierają znaczącego efektu – jak we wspomnianym przypadku polimorfizmu rs1937. W analizie z wykorzystaniem programu MDR nie otrzymano istotnego modelu zawierającego haplogrupę H lub klaster HV. Może to sugerować, że na tle pozostałych zidentyfikowanych czynników wpływ haplogrupy w interakcjach z polimorfizmem rs1937 jest słabszy od pozostałych zmiennych. Jest także możliwe, że haplogrupa H bądź klaster HV oddziałują z innymi, nieuwzględnionymi w niniejszym badaniu czynnikami genetycznymi lub szeroko pojętymi czynnikami środowiskowymi. Jednym z nich może być np. poziom estrogenu u kobiet, co sugeruje uzyskany wynik wskazujący, że haplogrupa H i klaster HV są czynnikiem ryzyka raczej specyficznym dla kobiet (Yaffe i wsp., 2007; Rosario i wsp., 2006; Felty i Roy, 2005).

---

## 5.7 Struktura grupy badanej wpływa na identyfikację genetycznych czynników ryzyka AD

Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane w grupach zawierających większą proporcję kobiet w stosunku do mężczyzn. Mężczyźni stanowią ok. 1/3 całej grupy LOAD, co oddaje ich udział w populacji osób starszych i osób chorych na LOAD (Ferrucci i wsp., 2008; Azad i wsp., 2007; Santoro i wsp., 2010). W badanej grupie stulatków stosunek liczby kobiet do mężczyzn jest jeszcze większy, oddając jednak rzeczywiste tendencje opisywane w literaturze przedmiotu, gdzie mężczyźni zwykle stanowią ok. 15% grupy stulatków (Perls, 2004). Sugeruje się, że mniejsza liczba mężczyzn-stulatków w porównaniu z kobietami wynika z tego, że do osiągnięcia długowieczności przez mężczyzn niezbędna jest inna, bardziej skomplikowana kombinacja czynników genetycznych i środowiskowych.

Stulatkowie zostali włączeni do opisywanych w tej rozprawie badań ze względu na to, że chociaż osiągnięcie długowieczności kojarzy się raczej z pomyślnym starzeniem, to jednak większość z nich rozwija otępienie. W badanej grupie 60% stulatków rozwinęło LOAD, co jest zgodne z wynikami z innych badań, w których liczba stulatków z otępieniem waha się od ok. 40 do 75% (Perls, 2004; Blansjaar i wsp., 2000). Jednakże nie ma jednolitego stanowiska wśród badaczy, co do rozpowszechnienia otępienia u osób powyżej 85 r.ż., nie rozstrzygnięto także, czy jest ono nieuchronną konsekwencją procesu starzenia się (von Gunten i wsp., 2010; Blansjaar i wsp., 2000). Ostatnio dominuje pogląd, że zapadalność na AD rośnie wraz z wiekiem, osiągając w grupie stulatków najwyższą wartość (von Gunten i wsp., 2010).

Istnienie czynników genetycznych związanych z ryzykiem LOAD i specyficznych względem płci może zależeć od zmian hormonalnych towarzyszących procesowi starzenia. Wiadomo także, że płeć wpływa na towarzyszący starzeniu poziom stresu oksydacyjnego, a estrogeny modulują ekspresję genów mitochondrialnych i mitochondrialne przemiany energetyczne (Viña i Lloret, 2010; Burris i Krishnan, 2005). Ponadto, estrogeny i androgeny pełnią także rolę antyoksydacyjną i neuroprotekcijną (Viña i Lloret, 2010). Uważa się, że menopauza pozbawia kobiety skutecznej ochrony antyoksydacyjnej przed działaniem A $\beta$  (Viña i Lloret, 2010). Ponadto, niski poziom estradiolu i testosteronu, odpowiednio u starszych kobiet i mężczyzn, jest powiązany ze spadkiem funkcji poznawczych i pogorszeniem pamięci (Yaffe i wsp., 2007; Rosario i wsp., 2006; Felty i Roy, 2005). Wszystkie te czynniki mogą wpływać na wyniki badań asocjacyjnych zmienności mtDNA.

## 5.8 Uwagi końcowe

Pierwsze doniesienia na temat otępienia pochodzą z 7 w. p.n.e., a jego opis przypisywany jest Pitagorasowi. Wtedy postrzegano je jako nieuchronny składnik procesu starzenia (Berchtold i Cotman, 1998). Upłynęło wiele stuleci zanim Alois Alzheimer opisał chorobę nazwaną potem od jego nazwiska chorobą Alzheimera (Alzheimer, 1907). Minęło następnych kilkadziesiąt lat zanim poznano pierwszy

pewny genetyczny czynnik ryzyka LOAD - allel *APOE4* (Strittmatter i wsp., 1993, Corder i wsp., 1993), a także zidentyfikowano mutacje w trzech genach związanych przyczynowo z rodzinną postacią AD. Dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej i bioinformatyki w ostatnich latach daje realne nadzieje na kolejny przełom - określenie całego spektrum czynników genetycznych wpływających na etiopatogenezę AD i opracowanie skutecznych metod leczenia i zapobiegania AD.

Poważnym problemem badań asocjacyjnych, dotyczącym zarówno AD, jak i innych chorób wieloczynnikowych, jest brak powtarzalności pomiędzy wstępnymi wynikami, a uzyskanymi w innych populacjach, co może być powodowane zbyt małą liczebnością grupy badanej, uniemożliwiająca wykrycie związku wariantów o niskiej częstości, czy wewnętrzną stratyfikacją badanej populacji. Przyczyną niespójności wyników badań prowadzonych w różnych populacjach mogą być także interakcje międzygenowe oraz początkowe wyniki fałszywie pozytywne, bądź fałszywie negatywne wyniki badań replikacyjnych (Bettens i wsp., 2010). Należy też pamiętać, że wyniki negatywne są rzadziej publikowane, co utrudnia metaanalizę badań.

Zwiększenie powtarzalności wyników pomiędzy różnymi ośrodkami badawczymi wymaga być może standardów, jakie powinna spełniać grupa kontrolna. Obecnie są już wypracowane standardy dla osób chorych z AD (Mc Khan i wsp., 1984; de Meyer i wsp., 2010), natomiast w świetle najświeższych badań będzie można je wprowadzić także dla grupy kontrolnej, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo zaklasyfikowania do tej grupy osób, które rozwiną AD. Jednym z wskazań mogłoby być sprawdzenie poziomu biomarkerów AD, np.  $A\beta_{42}$  oraz tau-181P w płynie mózgoworodzeniowym, co pozwoli podzielić grupy badane na podgrupy o większym i mniejszym ryzyku AD (de Meyer i wsp., 2010). Należy zaznaczyć, że słabą stroną wielu dotychczasowych badań, w tym zawartych w tej rozprawie, jest brak pewnej diagnozy AD u chorych. Jak wiadomo, zgodność pomiędzy diagnozą prawdopodobnej a pewnej AD wynosi 85% (Knopman i wsp., 2001).

Chociaż w bazie Alzgene, zbierającej wyniki badań nad genetycznym podłożem AD zgromadzono już dane o 664 genach i 2902 polimorfizmach potencjalnie istotnych w etiopatogenezie AD, nadal niewiele wiadomo o genetycznych korelatach procesów neurodegeneracji ([www.alzgene.org](http://www.alzgene.org), odwiedzona 16.10.10). Badania GWAS, których jednym z celów jest poprawa siły badań asocjacyjnych, jak dotąd nie doprowadziły do zidentyfikowania zmian, które wiązałyby się z porównywalnym ryzykiem zachorowania na AD, co *APOE4* (Sleegers i wsp., 2010; Lambert i Amouyel, 2011). Wykrywany związek loci stwierdzanych jako istotne w badaniu GWAS charakteryzuje iloraz szans o wartości 1,15-2,0, który jest porównywalny z uzyskiwanym w "zwyczajnych" badaniach asocjacyjnych (Laumet i wsp., 2010). Tymczasem badania *in silico* sugerują, że istnieją jeszcze przynajmniej 4 geny, których allele mają podobną bądź większą siłę oddziaływania, co allel *APOE4* (Daw i wsp., 2000).

W chorobach wieloczynnikowych, takich jak AD, długo dominowało podejście opierające się na hipotezie głoszącej, że choroby o wysokim rozpowszechnieniu powodowane są występowaniem jednego bądź kilku polimorfizmów o wysokiej częstości występowania (*Common Disease, Common*

---

*Variant, CDCV, hypothesis*). To założenie wykorzystuje m.in. analiza GWAS, jednak coraz więcej danych wskazuje na to, że badania te nie prowadzą do wyjaśnienia znaczącej części podłoża genetycznego chorób powszechnie występujących (Schrok i wsp., 2010). Z CDCV zgodne jest też zidentyfikowanie w niniejszej rozprawie haplogrupy H oraz klastera HV jako czynników ryzyka LOAD.

Podjęcie alternatywne zakłada, że wiele wariantów o niskiej częstości występowania w populacji (<5%), o addytywnym działaniu, prowadzi do chorób powszechnie występujących (*Common Disease, Multiple Rare Variants, CDMRV, hypothesis*) (Pritchard, 2001; Gorlov i wsp., 2010). Hipotetycznie, można założyć, że czynniki genetyczne niewykryte w badaniach GWAS (tzw. *missing heritability*), wynikają z obecności subtelnych interakcji genów ze środowiskiem, wariantów powszechnie występujących o niskiej penetracji, skomplikowanych oddziaływań epistatycznych, w których uczestniczy wiele wariantów powszechnie występujących czy zjawisk epigenetycznych (Schrok i wsp., 2010). Jednocześnie poszukuje się rzadkich wariantów, spodziewając się, że ich sumaryczny efekt jest silniejszy od pojedynczych powszechnie występujących polimorfizmów. Zasadne wydaje się przyjęcie, że obie hipotezy, CDCV i CDRV, stanowią słuszne podejście do rozwikłania podłoża genetycznego takich chorób jak AD. Oczekuje się, że dzięki zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji (*next generation sequencing*), uda się wyodrębnić zestawy rzadkich zmian. Jednocześnie prowadzone są badania nad wyodrębnieniem tzw. *synthetic associations*, tworzonych przez rzadkie warianty stochastycznie związane z jednym z alleli wariantów uwzględnianych w analizach GWAS (Dickson i wsp., 2010). Badania Dickson i wsp. (2010) pokazują, że sygnał wykryty w badaniu GWAS dla powszechnie występującego wariantu może powstać dzięki obecności rzadkich wariantów z nim związanych. Poszukiwanie rzadkich wariantów stanowi nowy, bardzo obiecujący nurt badań (Walsh i wsp., 2008; Ji i wsp., 2008).

Związek z ryzykiem AD opisanych w niniejszej pracy wariantów mitochondrialnego i jądrowego DNA samodzielnie nie dorównuje sile oddziaływania allelu *APOE4*. Jednak stwierdzone oddziaływania epistatyczne wskazują, że *APOE4* wraz z innymi czynnikami może odgrywać jeszcze większą rolę w zachorowaniu na AD. Stwierdzone interakcje pomiędzy *APOE4* i podhaplogrupą H5 oraz pomiędzy polimorfizmem rs1937 w genie *TFAM* i *APOE4* wskazują na konieczność kontynuowania badań nad związkiem zmienności mtDNA z AD. Ponadto, sugerują, że należy rozpatrywać nie tylko efekty główne badanych zmiennych, ale także ich wzajemne oddziaływania. Opisany w niniejszej rozprawie związek pojedynczych polimorfizmów, chociaż o mniejszym wpływie na ryzyko AD w porównaniu z *APOE4*, wymaga sprawdzenia w większych grupach badanych. Możliwe, że wykryte asocjacje, rozpatrywane na tle innych zmian w genomie nosicieli mogą wywierać sumarycznie większą siłę oddziaływania na ryzyko AD.

Dotychczasowe próby kliniczne dotyczące szczepionek przeciw A $\beta$  czy inhibitorów  $\gamma$ -sekreazy zawiodły pokładane w nich oczekiwania. Coraz więcej danych przekonuje, że leczenie ukierunkowane na pozbycie się blaszek amyloidowych nie przynosi rezultatów. Słuszny wydaje się

nowy kierunek działań terapeutycznych, mający na celu poprawę funkcji mitochondriów. Obiecujący lek, który miał poprawić funkcjonowanie mitochondriów, Dimebon, w kolejnych próbach klinicznych nie okazał się skuteczny (Jones, 2010). Również doświadczenia ze stosowaniem terapii antyoksydantami (m.in. witamina C, E, koenzym Q) nie przynoszą spektakularnych rezultatów. Prowadzone są próby z zastosowaniem antyoksydantów o udoskonalonej właściwości przenikania do mitochondriów (MitoQ, MitoVitE, MitoPBN) oraz stosowaniem agonistów PPAR $\gamma$  oraz aktywacją jego koaktywatora, PGC-1 $\alpha$ . Próbuje się także ponownie znaleźć zastosowanie dla znanego od dawna leku nootropowego, piracetamu. Znana jest jego rola w zwiększaniu płynności błon mitochondrialnych oraz we wzmaganiu zużycia glukozy i tym samym, większej produkcji ATP (Leuner i wsp., 2010, Domańska-Janik i Zaleska, 1977). Być może przyczyny niepowodzeń dotychczasowych prób leczenia leżą w nieznanym genetycznym podłożu AD – zmienności zarówno genomu jądrowego, jak – co może ważniejsze – mitochondrialnego. Interesujące zatem byłoby porównanie, jak reagują na terapię piracetamem czy innymi wymienionymi wyżej lekami chorzy posiadający haplogrupy mitochondrialne związane ze sprzężaniem/roz sprzężaniem fosforylacji oksydacyjnej. Niewykluczone, że dotychczasowe niepowodzenia związane z terapią ukierunkowaną na poprawę funkcji mitochondriów mogą być powodowane nieuwzględnieniem w badaniach haplogrup mitochondrialnych, zwłaszcza tych związanych z fenotypem sprzężenia/roz sprzężenia fosforylacji oksydacyjnej. Dalsza stratyfikacja chorych względem posiadanych wariantów, a także uwzględnienie endofenotypów może udoskonalić planowanie badań klinicznych oraz pozwolić uzyskiwać lepsze efekty terapeutyczne.

Należy oczekiwać, że coraz pełniejsza znajomość genetycznych czynników ryzyka, uczestniczących w rozwoju AD, umożliwi rozpoznanie etiologii tej niezwykle groźnej, także ze społecznego punktu widzenia, choroby oraz ułatwi opracowanie skutecznych sposobów jej leczenia i zapobiegania, uwzględniających środowiskowe czynniki ryzyka oraz genotyp konkretnego pacjenta.





## 6 WNIOSKI

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały istnienie kilku istotnych genetycznych czynników ryzyka zachorowania na chorobę Alzheimera oraz wskazują także czynniki protekcyjne. Wspomniane czynniki genetyczne, z których kilka zostało zidentyfikowanych po raz pierwszy, powiązane są ze zmiennością mitochondrialnego DNA oraz wybranych genów jądrowych (*APOE*, *TFAM*, *PGC-1 $\alpha$* , *HFE*, *PINI*).

W rezultacie badań ustalono, że:

1. Haplogrupa H, wiązana ze sprzężaniem fosforylacji oksydacyjnej, oraz klaster HV, stanowią czynnik ryzyka LOAD.
2. Haplogrupy i podhaplogrupy mtDNA (U4, U5a1, K, J, T) wiązane z częściowym rozprzężaniem fosforylacji oksydacyjnej stanowią czynnik zmniejszający ryzyko LOAD.
3. Nosicielstwo haplogrupy H sprzyja wcześniejszej konwersji z MCI do LOAD w porównaniu z nosicielami haplogrupy U.
4. Allel *APOE4* jest istotnym czynnikiem ryzyka zachorowania na LOAD, ale nie w grupie stulatków.
5. Genotyp GG polimorfizmu rs2306604 *TFAM* jest czynnikiem ryzyka EOAD.
6. U osób o statusie *APOE4*- czynnikiem ryzyka LOAD są nosicielstwo wariantu 482Ser *PGC-1 $\alpha$* , oraz genotypu GG polimorfizmu rs2306604.
7. Nosicielstwo przynajmniej jednego allelu 482Ser *PGC-1 $\alpha$*  istotnie zwiększa prawdopodobieństwo rozwinięcia LOAD u osób z diagnozą MCI.
8. Badane polimorfizmy *HFE* oraz *PINI* nie odgrywają znaczącej roli w zachorowaniu na EOAD i LOAD.
9. Zidentyfikowanie czterech nowych wariantów *PINI* (c.24G>T, c.58+64C>T, c.382+105C>T oraz g.9805834T>C), wpływających na ekspresję wspomnianego genu wskazuje, że należy prowadzić dalsze badania nad zmiennością sekwencji *PINI*, zwłaszcza w grupie u osób z rodzinną historią EOAD. Wariant c.58+64C>T jest związany z 2,82 razy niższą ekspresją mRNA *PINI* w limfocytach krwi obwodowej nosicielki w porównaniu z osobami zdrowymi.

Uzyskane wyniki pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

1. Analizując rolę haplogrup mtDNA należy przyjąć za grupę odniesienia dla nosicieli konkretnej haplogrupy mtDNA osoby będące nosicielami wszystkich pozostałych haplogrup mtDNA.
2. W badaniach nad podłożem genetycznym LOAD należy uwzględniać rodzaj posiadanej haplogrupy mtDNA jako potencjalny czynnik modyfikujący ryzyko zachorowania.
3. Mitochondrialne haplogrupy mogą wpływać w zróżnicowany sposób na ryzyko AD w zależności od wieku i płci badanych, stąd należy uwzględniając te zmienne w badanym modelu.

- 
4. Zmienność mtDNA nie odgrywa roli w zachorowaniu na EOAD.
  5. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność prowadzenia analizy oddziaływań epistatycznych między badanymi czynnikami ryzyka genetycznego. Uzasadniają także konieczność jednoczesnego badania zmienności genów jądrowych i mtDNA. Wskazują również na celowość wykorzystywania kilku niezależnych metod do sprawdzania zależności między badanymi zmiennymi.
  6. Uzyskane pozytywne asocjacje konkretnych wariantów genetycznych z fenotypem klinicznym powinny zostać zweryfikowane w większych grupach badanych, a także w grupach osób z innych niż polska populacji.

## 7 STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera jest schorzeniem heterogennym, w którym na indywidualne ryzyko zachorowania wpływa zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami ryzyka i czynnikami chroniącymi przed zachorowaniem. Niniejsza praca prezentuje badania, które doprowadziły do zidentyfikowania genetycznych czynników ryzyka AD oraz czynników protekcyjnych, w różnych grupach wiekowych (<65 lat, >65 lat, 100 lat). Grupa badana obejmowała 422 chorych z późnoobjawową chorobą Alzheimera (*late-onset Alzheimer's disease*, LOAD), 49 chorych z wczesnoobjawową chorobą Alzheimera (*early-onset Alzheimer's disease*, EOAD), 105 osób z diagnozą łagodnych zaburzeń poznawczych (*mild cognitive impairment*, MCI), 174 stulatków, oraz 318 osób neurologicznie zdrowych.

Wykryto kilka istotnych statystycznie genetycznych czynników ryzyka oraz czynników protekcyjnych związanych z zapadalnością na LOAD w średnim i starszym wieku. Wśród zidentyfikowanych czynników związanych z obniżeniem ryzyka rozwoju LOAD znajdują się polimorfizmy mitochondrialne (m.9055A, m.16224C, m.242T, m.497T) wchodzące w obręb haplogrup wiązanych z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej, które w przeprowadzonych analizach także okazały się protekcyjne. Ponadto, stwierdzono także, że haplogrupa K neutralizuje ryzyko związane z nosicielstwem allelu *APOE4*. W grupie kobiet czynnikiem protekcyjnym jest nosicielstwo klastera JT oraz haplogrupy T, natomiast w grupie mężczyzn przed zachorowaniem ma chronić nosicielstwo klastera KU. Uzyskane wyniki pozytywnie weryfikują hipotezę Wallace'a i wsp. (2003), dotyczącą protekcyjnego wpływu haplogrup i podhaplogrup wiązanych z rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej (U4, U5a1, K, J, T) na zapadalność na choroby neurozwyrodnieniowe – w tym przypadku LOAD.

Z drugiej strony zidentyfikowano genetyczne czynniki ryzyka rozwoju LOAD, w tym m.in. haplogrupę H, związaną ze sprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej, oraz klaster HV. Potwierdzono także znaną rolę allelu *APOE4* jako czynnika ryzyka LOAD. Wykazano, że interakcja pomiędzy podhaplogrupą H5 a *APOE4* powoduje znaczący wzrost ryzyka zachorowania na LOAD w porównaniu z samym wpływem nosicielstwa przynajmniej jednego allelu *APOE4*. Ponadto, oddziaływanie pomiędzy allelem *APOE4* oraz genotypem GG polimorfizmu rs1937 także ma charakter interakcji, wywierającej silniejszy wpływ na ryzyko zachorowania na LOAD niż sam status *APOE4*. Stwierdzono, że u osób o statusie *APOE4*- genotyp GG polimorfizmu rs2306604 *TFAM* oraz nosicielstwo allelu 482Ser jest związane z wyższym ryzykiem zachorowania na LOAD.

W grupie chorych na LOAD zidentyfikowano jeden nowy wariant w regionie promotorowym *PINI* (g.9805834T>C). Ponadto, u 2 chorych na LOAD wykryto wariant stwierdzony w grupie EOAD, c.58+64C>T. Ekspresja mRNA *PINI* u nosicielki substytucji c.58+64C>T była 2,82 razy niższa niż w grupie kontrolnej.

W grupie chorych w wieku poniżej 65 lat zidentyfikowano kilka nowych czynników ryzyka EOAD. Stwierdzono obecność nowych wariantów w genie *PINI* oraz wykazano, że genotyp GG

---

polimorfizmu rs2306604 w genie *TFAM* jest związany z większym ryzykiem zachorowania na EOAD. Ponadto, stwierdzono interakcję o charakterze synergistycznym pomiędzy polimorfizmem rs2010457 *PIN1* z His63Asp *HFE*, zwiększająca ryzyko EOAD. Nie stwierdzono wpływu zmienności mtDNA na ryzyko EOAD.

W grupie stulatków czynnikiem zmniejszającym ryzyko zachorowania na LOAD jest polimorfizm mtDNA, m.16126C, natomiast czynnikiem ryzyka LOAD jest polimorfizm m.16183C. Nie potwierdzono związku nosicielstwa klastra HV i haplogrupy H z zachorowaniem na LOAD w tej grupie wiekowej. Ponadto, stwierdzono, że allel *APOE4* nie jest czynnikiem ryzyka LOAD w grupie stulatków. Nosicielstwo haplogrupy J czy klastra JT nie sprzyja osiągnięciu długowieczności.

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność jednoczesnego badania zmienności genów jądrowych i mtDNA przy ustalaniu ryzyka AD. Wskazują również na zasadność przeprowadzania analizy oddziaływań epistatycznych między badanymi genetycznymi czynnikami AD.

## 8 SUPLEMENT

**Tabela S 1.** Warunki PCR do amplifikacji regionu kontrolnego mtDNA z zastosowaniem pary starterów F15997 i R649 oraz par starterów RK1-RK6. Startery RK1-RK6 były wykorzystywane do amplifikacji regionu kontrolnego preparatów DNA, których amplifikacja z użyciem starterów F15997 i R649 nie powiodła się.

Warunki reakcji dla par starterów:	F15997 i R649		RK1F i RK1R; RK3F i RK3R; RK4F i RK4R; RK5F i RK5R		RK2F i RK2R; RK6F i RK6R	
Etapy:	T [°C]	Czas	T [°C]	Czas	T [°C]	Czas
<b>Wstępna denaturacja</b>	94°C	2 min 30s	94°C	2 min 30s	94°C	2 min 30s
<b>Amplifikacja</b>	94°C	30 s	94°C	30 s	94°C	30 s
<b>sekwencji</b>	56°C	1 min	56°C	30 s	54°C	30 s
<b>(35 cykli)</b>	72°C	1 min	72°C	45 s	72°C	45 s
<b>Końcowa elongacja</b>	72°C	7 min	72°C	7 min	72°C	7 min

**Tabela S 2.** Startery do amplifikacji regionu kontrolnego (RK) w sześciu zachodzących na siebie fragmentach.

Starter	Sekwencja startera (5'→3')	Temperatura przyłączania się pary starterów	Wielkość amplikonu
RK1F RK1R	TCCACCATTAGCACCCAAAG AGGGGGTTTTGATGTGGATT	56°C	214 pz
RK2F RK2R	GCCACCATGAATATTGTACG ACGAGAAGGGATTTGACTGT	54°C	253 pz
RK3F RK3R	AACCTACCCACCCCTTAACAG GTGTGGGCTATTTAGGCTTT	56°C	259 pz
RK4F RK4R	TATCCGACATCTGGTTCCTA TGAACGTAGGTGCGATAAAT	56°C	254 pz
RK5F RK5R	CTTTGATTCCTGCCTCATCC GGGTTTGGCAGAGATGTGTT	56°C	224 pz
RK6F RK6R	TTCTGGCCACAGCACTTA GAGCCCGTCTAAACATTTTC	54°C	313 pz

F, *forward*, starter 5'; R, *reverse*, starter 3'; pz – para zasad

**Tabela S 3.** Zestawienie polimorfizmów w części kodującej mitochondrialnego DNA, wykorzystanych do zaklasyfikowania badanych do podhaplogrupy bądź podtypu haplogrupy H, wraz z sekwencjami starterów do amplifikacji odpowiednich odcinków mtDNA. W przypadku zastosowania dodatkowej ilości jonów magnezu (MgCl<sub>2</sub>), poza zawartymi w używanym buforze zaznaczono jego końcowe stężenie w ostatniej kolumnie tabeli.

Podhaplogrupa	Polimorfizm mtDNA definiujący podhaplogrupę	Startery (5'→3')	Temperatura hybrydyzacji starterów	Długość amplikonu	Mg <sup>2+</sup> (mM)
H1	3010G>A	F ACTCAATTGATCCAATAACTTGACC R GTAGATAGAAACCGACCTGGATTAC	60°C	219 pz	-
H1-709	709G>A	F GGCTCACATCACCCATAAAA R GCTTGATGCTTGTTCCTTTTG	56°C	138 pz	-
H2	1438A>G	F TGGCAAGAAATGGGCTACAT R GTGTGTACGCGCTTCAGG	60°C	135 pz	-
H3	6776T>C	F GTCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC R GTGTGTCTACGTCTATTCCCTACTGTAAACA	60°C	189 pz	0,8
H4a	4024T>A	F CCCTTCGCCCTATTCTTCAT R GGGAGGTTAGAAGTAGGGTCTTG	59°C	151 pz	1
H4	5004T>C	F CCATCATAGCAGGCAGTTGA R AGGAATGCGGTAGTAGTTAGGA	58°C	169 pz	1
H5a	4336T>C	F AGCATTCCCCCTCAAACCTA R ATGGGCCCGATAGCTTATTT	56°C	192 pz	1
H7	4793A>G	F CCGGACAATGAACCATAACC R TGATTGAGATGGGGGCTAGT	56°C	183 pz	1
H9	13020T>C	F CCCACAACAAATAGCCCTTC R TGGAGTAGGGCTGAGACTGG	56°C	153 pz	1
H10	14470T>A	F CCCCATGCCTCAGGATACTC R TGATTGTTAGCGGTGTGGTC	56°C	154 pz	-
H13	14872C>T	F CAACATCTCCGCATGATGAA R ATTGATGAAAAGGCGGTTGA	54°C	123 pz	1
H14	7645T>C	F ACATGCAGCGCAAGTAGGTC R GGGCATAACAGGACTAGGAAGC	59°C	119 pz	1
H16	10394C>T	F CCCTACCATGAGCCCTACAA R AATGAGGGGCATTTGGTAAA	56°C	203 pz	-
H12	3936C>T	F TCATGACCCTTGGCCATAAT	56°C	151 pz	1
H17	3915G>A	R ATTCGGCTATGAAGAATAGGG			
H23	10211C>T	F ACCACAACCTCAACGGCTACA R TTGTAGGGCTCATGGTAGGG	56°C	169 pz	-
H25	9620C>T	F GCCTTTTACCACTCCAGCCTA R TGGTGAGCTCAGGTGATTGA	56°C	149 pz	-
H26	11152>C	F CGCCACTTATCCAGTGAACC R GGAAGTATGTGCCTGCGTTC	56°C	205 pz	-
H33	11447G>C	F TGACTCCCTAAAGCCCATGT R TTTTGTTCAGGGGTTGAGAA	56°C	123 pz	1
H24	3333C>T	F CACCCAAGAACAGGGTTTGT	56°C	170 pz	-
H35	3342C>T	R TCGTTCGGTAAGCATTAGGA			
H37	3531G>A	F TCTTCACCAAAGAGCCCTA R GCCTAGGTTGAGGTTGACCA	56°C	140 pz	-

F, forward, starter 5'; R, reverse, starter 3'; pz – para zasad

**Tabela S 4.** Zestawienie sekwencji starterów wykorzystywanych do amplifikacji fragmentów genu *PINI* wraz z jego regionem promotorowym. Przedstawiono także wielkości tworzonych amplikonów, temperaturę przyłączania się starterów oraz stosowane dodatkowe składniki mieszaniny reakcyjnej, tj. bufor Q (Q-Solution) i jony magnezu ( $MgCl_2$ ). Podano ich końcowe stężenia w mieszaninie reakcyjnej.

Starter	Sekwencja startera (5'→3')	Wielkość amplikonu	Temperatura hybrydyzacji starterów	Dodatkowe składniki	
				$Mg^{2+}$	bufor Q
<b>Prom1F*</b> <b>Prom1R</b>	ATGAAGTCTCGCTCTGTACCT GCAGTAGAAGGCTAAGAGAAGTCTG	473 pz	60°C	0,5 mM	-
<b>Prom2F</b> <b>Prom2R</b>	ATTGGGAAACCGAAGTACAGAGTA TTGGAACCTGCTTACTTCCTTATT	475 pz	60°C	0,5 mM	-
<b>Prom3F</b> <b>Prom3R</b>	CCGTGTTCTTATATGAATGTCAATG GGGATAGAGCTTATGGATTGGCTA	446 pz	60°C	0,5 mM	-
<b>Prom4F</b> <b>Prom4R</b>	TTGCTATGGCAACAGCAGAG ATTGGCTTTCTGGCCTTCTATT	402 pz	60°C	0,5 mM	-
<b>Prom5+ex1F</b> <b>Prom5+ex1R</b>	CCGCCAGCCTTTCTTCTAC CTCAGCTTCCTCAGCTTCC	446 pz	63°C	-	1X
<b>ex2F</b> <b>ex2R</b>	GATACACCATGGATTTGTTGAATG GTGAAGGTCAGGGTCAGGTC	499 pz	60°C	0,5 mM	-
<b>ex3F</b> <b>ex3R</b>	GTATGTGTGAGGAGAGGGGTTGT CCTCTGAAGCCTGAGGAAGG	428 pz	63°C	-	-
<b>ex4aF</b> <b>ex4aR</b>	GATGAGTGTGGACGAGTGTGAG GAAGTCAATTCCTTAAGGGAGAATC	477 pz	63°C	-	-
<b>ex4bF</b> <b>ex4bR</b>	CCTGTCCATCCCCAGTTG AGCTGGGACCCCTTAGGATG	402 pz	65°C	-	-

F, *forward*, starter 5'; R, *reverse*, starter 3'; pz – para zasad;

\* "Prom" wskazuje, że startery przyłączają się do promotora, „ex” - starter służył do amplifikacji eksonu; Ekson 1 był amplifikowany wraz z proksymalnym fragmentem promotora, stąd startery do tego fragmentu sekwencji *PINI* nazwano PROM5+ex1.

**Tabela S 5.** Zestawienie warunków temperatury rozdziału techniką DHPLC dla badanych amplikonów, zsyntetyzowanych przy pomocy starterów PROM1F i R, PROM2F i R, PROM3Fi R, PROM5+ex1F i R, Ex2F i R, Ex3F i R.

Amplikon powstały w wyniku amplifikacji z wykorzystaniem zestawu starterów o symbolu:	Temperatura rozdziału (°C)
PROM1	58
PROM2	61,5
PROM3	62
PROM5+ex1	71
Ekson2 (Ex2)	65,5
Ekson3 (Ex3)	66

**Tabela S 6.** Zestawienie sond i starterów do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli polimorfizmów w mitochondrialnym DNA, charakterystycznych dla najczęstszych mitochondrialnych haplogrup populacji kaukaskiej (van der Walt i wsp., 2004). MGB (*Minor Groove Binder*) jest białkiem przyłączającym się do mniejszej bruzdy DNA, stabilizującym kompleks matryca DNA-sonda.

Polimorfizm mtDNA	Nazwa sondy/ startera	Sekwencja	Barwnik report-rowy (5')	Barwnik tlumiący (3')	MGB	
13708G>A	Sondy	snp13708A	CTTCCGGCTGTCCAGCGTTTAATG	FAM	TAMRA	---
		snp13708G	TTCCGGCTGCCAGGCGTTT	VIC	TAMRA	---
	Startery	13708F	AATCTTCTCACCTAACAGGTCAA	---	---	---
		13708R	CGAGGGCTGTGAGTTTAAAGGTAGA	---	---	---
9055G>A	Sondy	snp9055G	CCTAATTGGAAGCGCCACCCTAGC	FAM	TAMRA	---
		snp9055A	TGCACCTAATTGGAAGCACCCCTA	VIC	TAMRA	---
	Startery	9055F	CTAACATTACTGCAGGCCACCTACT	---	---	---
		9055R	TGTAGAGGGAAGGTTAATGGTTGAT	---	---	---
13368G>A	Sondy	snp13368G	TGTGCTCCGGGTCCATCATCC	FAM	TAMRA	---
		snp13368A	CTATTTATGTGCTCCGGATCCATCATCC	VIC	TAMRA	---
	Startery	13368F	CCCACGCCTTCTCAAAGC	---	---	---
		13368R	CGAATATCTTGTTCATTGTTAAGGTTGT	---	---	---
12308A>G	Sondy	snp12308A	AGGCCCAAAAAATTTTGGTGCAAC	FAM	TAMRA	---
		snp12308G	AGGCCCAAGAATTTTGGTGCAAC	TET	TAMRA	---
	Startery	12308F	TACCGAAGAAGCTCACAAGAAGCTG	---	---	---
		12308R	GGAAGTCAGGGTTAGGGTGGTTATA	---	---	---
1719G>A	Sondy	snp1719A	AGACAACCTTAACCAAAC	FAM	NFQ	MGB
		snp1719G	CCTTAGCCAAACCAT	TET	NFQ	MGB
	Startery	1719F	CCCAAACCCACTCCACCTTAC	---	---	---
		1719R	CGCCAGGTTTCAATTTCTATCG	---	---	---
7028C>T	Sondy	snp7028T	TGTAGCTCACTTCCACTAT	TET	NFQ	MGB
		snp7028C	ACG TTG TAG CCC ACT T	FAM	NFQ	MGB
	Startery	7028F	TGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCA	---	---	---
		7028R	GATGGCAAATACAGCTCCTATTGA	---	---	---
4580G>A	Sondy	snp4580A	CCTAGAAATAAACATACTAGCT	FAM	NFQ	MGB
		snp4580G	CTAGAAATAAACATGCTAGC	VIC	NFQ	MGB
	Startery	4580F	GCACACTCATCACAGCGCTAA	---	---	---
		4580R	GGTTGCTTGCGTGAGGAAAT	---	---	---
8251G>A	Sondy	snp8251A	TCTTTGAAATAGGACCCGTAT	FAM	NFQ	MGB
		snp8251G	TCTTTGAAATAGGGCCCGTA	VIC	NFQ	MGB
	Startery	8251F	CATGCCCATCTCTCCTAGAAATTA	---	---	---
		8251R	AAGTTAGCTTTACAGTGGGCTCTAGAG	---	---	---
10398A>G	Sondy	snp10398A	TAGACTGAACCGAATTG	FAM	NFQ	MGB
		snp10398G	AGACTGAGCCGAATT	VIC	NFQ	MGB
	Startery	10398F	CTACAAACAACCTGCCACTAATAG	---	---	---
		10398R	GGGCATTGGTAAATATGATTATCA	---	---	---

F, forward, starter 5'; R, reverse, starter 3'

**Tabela S 7.** Zestawienie stosowanych sond do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli polimorfizmów genów jądrowych, rs8192678, rs1937, rs2306604, rs1800562 oraz rs1799945. W sekwencji sondy w nawiasie kwadratowym zaznaczono badany polimorfizm. Pierwszy allel jest znakowany fluorochromem VIC, drugi - FAM.

Polimorfizm	Gen	Zestaw sond i starterów	Sonda [VIC/FAM]
rs8192678	<i>PGC-1α</i>	C__1643192_20	CTGAAATCACTGTCCCTCAGTTCAC[C/T]GGTCTTGTCTGCTTCGTCGTCAAAA
rs1937	<i>TFAM</i>	C__8975662_10	CTCCGAAGCATGTGGGGCGTGCTGA[C/G]TGCCCTGGGAAGGCTGGAGCAGAG
rs2306604	<i>TFAM</i>	C__1953826_1_	AATAAAATATGGTAGAATGCATCA[A/G]GTATTCTCAGTTAGGCAGAAGTGG
rs1800562	<i>HFE</i>	C__1085595_10	CCTGGGGAAGAGCAGAGATATACGT[G/A]CCAGGTGGAGCACCCAGGCTGGAT
rs1799945	<i>HFE</i>	C__1085600_10	TGACCAGCTGTTCGTGTCTATGAT[C/G]ATGAGAGTCGCCGTGGAGCCCCG



**Tabela S 8.** Mieszanina reakcyjna do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli polimorfizmów w mtDNA, charakterystycznych dla najczęstszych mitochondrialnych haplogrup w populacji kaukaskiej.

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej dla polimorfizmów mtDNA w pozycjach:</b>	<b>12308, 7028, 10398, 8251</b>	<b>13708, 13368, 1719, 4580</b>
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	3 µl	3 µl
Starter F	0,1 µl	0,2 µl
Starter R	0,1 µl	0,2 µl
Sonda 1	0,07 µl	0,09 µl
Sonda 2	0,07 µl	0,09 µl
Genomowe DNA	5-20ng/µl	5-20ng/µl
H <sub>2</sub> O	uzupełnić do 10 µl	uzupełnić do 10 µl

**Tabela S 9.** Mieszanina reakcyjna do przeprowadzenia analizy dyskryminacji alleli z zastosowaniem zestawu sond TaqMan i starterów (TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay) dla polimorfizmów rs8192678, rs1937, rs2306604, rs1800562 oraz rs1799945.

<b>Skład mieszaniny</b>	<b>Objętość dla 1 preparatu</b>
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	2,5 µl
20X TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping assay Mix	0,125 µl
Genomowe DNA	5-20ng/µl
H <sub>2</sub> O	uzupełnić do 10 µl

**Tabela S 10.** Zestawienie sekwencji starterów dla genu badanego (*PINI*) i genu referencyjnego (*SDHA*).

<b>Nazwa startera</b>	<b>Sekwencja startera (5'→3')</b>
PINIF	AGTCGGGAGAGGAGGACTTT
PINIR	CAAACGAGGCGTCTTCAAAT
SDHAF	ACTGGATACTGAGCAGAAATGGAAT
SDHAR	CGAGGTTTTCACCTCACTGTTGA

F, *forward*, starter 5'; R, *reverse*, starter 3'**Tabela S 11.** Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia *real-time* PCR.

<b>Skład mieszaniny</b>	<b>Stężenie/ilość składników</b>
Power Sybr Green PCR Master Mix (2X)	1X
Starter F	0,25 mM
Starter R	0,25 mM
Cdna	20 ng
H <sub>2</sub> O	uzupełnić do 25 µl

**Tabela S 12.** Zestawienie częstości podhaplogrup i ich podtypów w grupie AD oraz w grupie kontrolnej. W pierwszej kolumnie po lewej stronie przedstawiono jednostkę nadrzędną względem opisanych w kolejnych kolumnach haplogrup/podhaplogrup i ich podtypów. W przypadku makrohaplogrupy R dokonano uproszczenia- jest ona nadrzędną haplogrupą w stosunku do klasterów UK, JT i HV, jednak dla przejrzystości przedstawiono ją osobno na końcu tabeli.

Klaster haplogrup/ Makrohaplogrupa	Haplogrupa - podhaplogrupa - podtyp		Chorzy z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	Kobiety z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna - kobiety, n (%)	Mężczyźni z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna- mężczyźni, n (%)		
HV	H	H1	H1*	29 (6,87)	17 (5,35)	18 (6,62)	14 (6,09)	11 (7,33)	3 (3,41)	
			H1a	2 (0,47)	2 (0,63)	2 (0,73)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,27)	
			H1a1	3 (0,71)	3 (0,71)	2 (0,73)	3 (1,30)	1 (0,67)	0 (0,0)	
			H1a3	0 (0,0)	3 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	1 (1,14)	
			H1b	18 (4,26)	7 (2,20)	9 (3,31)	4 (1,74)	9 (6,0)	3 (3,41)	
			H1c	24 (5,69)	14 (4,40)	14 (5,15)	9 (3,91)	10 (6,67)	5 (5,68)	
			H1c1	2 (0,47)	1 (0,31)	2 (0,73)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)	
			H1f	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H1k	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
		H2	H2*	4 (0,95)	3 (0,71)	2 (0,73)	1 (0,43)	2 (1,33)	2 (2,27)	
			H2a1	7 (1,66)	5 (1,57)	6 (2,21)	4 (1,74)	1 (0,67)	1 (1,14)	
			H2a2b1	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
			H2a3	2 (0,47)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	1 (0,67)	0 (0,0)	
			H2a5	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H3	H3	11 (2,61)	11 (3,46)	8 (2,94)	9 (3,91)	3 (2,0)	2 (2,27)	
		H4	H4a	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
			H4a1a1	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)	
			H4a1b	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H5*36	H5*	3 (0,71)	4 (1,26)	2 (0,73)	1 (0,43)	1 (0,67)	3 (3,41)	
			H5a	20 (4,74)	8 (2,52)	13 (4,78)	8 (3,48)	7 (4,67)	0 (0,0)	
			H36	1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		H6	H6	9 (2,13)	8 (2,52)	8 (2,94)	5 (2,17)	1 (0,67)	3 (3,41)	
			H7	H7*	3 (0,71)	3 (0,71)	2 (0,73)	2 (0,87)	1 (0,67)	1 (1,14)
				H7a1	1 (0,24)	2 (0,63)	0 (0,0)	2 (0,87)	1 (0,67)	0 (0,0)
		H7c1		1 (0,24)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		H8		2 (0,47)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		H9	H9*	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H10	H10*	3 (0,71)	2 (0,63)	3 (1,10)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)	
			H10a	0 (0,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	1 (1,14)	
		H11	H11*	3 (0,71)	1 (0,31)	2 (0,73)	1 (0,43)	1 (0,67)	0 (0,0)	
			H11a	7 (1,66)	5 (1,57)	4 (1,47)	5 (2,17)	3 (2,0)	0 (0,0)	
		H13	H13	1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
			H13a1	2 (0,47)	2 (0,63)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,27)	
			H13a2	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H15		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H16		6 (1,42)	0 (0,0)	3 (1,10)	0 (0,0)	3 (2,0)	0 (0,0)	
		H17		1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		H18		2 (0,47)	3 (0,94)	1 (0,37)	2 (0,87)	1 (0,67)	1 (1,14)	
		H21		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H24		2 (0,47)	1 (0,31)	2 (0,73)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		H27		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

		<b>H28</b>		1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)	
		<b>H31</b>		1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>H34</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>H*</b>		25 (5,92)	15 (4,72)	17 (6,25)	10 (4,35)	8 (5,33)	5 (5,68)	
	<b>HV1</b>		<b>HV1a1a1</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>HV1*</b>		2 (0,47)	1 (0,31)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	1 (1,14)
	<b>HV0</b>		<b>HV0*</b>		2 (0,47)	1 (0,31)	2 (0,73)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>HV0b'c</b>		3 (0,71)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	2 (1,33)	0 (0,0)
			<b>HV6a</b>		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	<b>V</b>		<b>V*</b>		9 (2,13)	4 (1,26)	5 (1,84)	2 (0,87)	4 (2,67)	2 (2,27)
<b>V7a</b>			4 (0,95)	4 (1,26)	2 (0,73)	4 (1,74)	2 (1,33)	0 (0,0)		
<b>IWX</b>	<b>I</b>	<b>I*</b>		2 (0,47)	2 (0,63)	0 (0,0)	2 (0,87)	2 (1,33)	0 (0,0)	
		<b>I1</b>	<b>I1</b>		1 (0,24)	2 (0,63)	1 (0,37)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>I1a</b>		3 (0,71)	2 (0,63)	1 (0,37)	2 (0,87)	2 (1,33)	0 (0,0)
		<b>I3</b>		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>I4</b>		1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
	<b>W</b>	<b>W1</b>	<b>W1b</b>		2 (0,24)	0 (0,0)	2 (0,73)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>W1e</b>		2 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,33)	0 (0,0)
		<b>W3</b>	<b>W3'5</b>		6 (1,42)	2 (0,63)	5 (1,84)	1 (0,43)	1 (0,67)	1 (1,14)
		<b>W5</b>	<b>W5a</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)
	<b>W6</b>		3 (0,71)	1 (0,31)	2 (0,73)	1 (0,43)	1 (0,67)	0 (0,0)		
	<b>X</b>	<b>X2</b>	<b>X2*</b>		0 (0,0)	3 (0,94)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	1 (1,14)
			<b>X2b</b>		3 (0,71)	0 (0,0)	3 (1,10)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>X2c</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)
	<b>JT</b>	<b>J</b>	<b>J1</b>	<b>J1*</b>		2 (0,47)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,33)
<b>J1b1a</b>				3 (0,71)	8 (2,52)	2 (0,73)	4 (1,74)	1 (0,67)	4 (4,54)	
<b>J1c</b>				12 (2,84)	10 (3,14)	9 (3,31)	6 (2,61)	3 (2,0)	4 (4,54)	
<b>J1c1</b>				1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>J1c1a</b>				2 (0,47)	4 (1,26)	1 (0,37)	2 (0,87)	1 (0,67)	2 (2,27)	
<b>J1c2</b>				3 (0,71)	5 (1,57)	2 (0,73)	2 (0,87)	1 (0,67)	3 (3,41)	
<b>J1c2c1</b>				1 (0,24)	2 (0,63)	1 (0,37)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>J1c6</b>				1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>J1c7</b>			2 (0,47)	1 (0,31)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	1 (1,14)		
<b>J2</b>			<b>J2a</b>		3 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,73)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)
			<b>J2a1</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
			<b>J2b</b>		2 (0,47)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	2 (1,33)	0 (0,0)
		<b>J2b1a</b>		0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>T</b>		<b>T*</b>		7 (1,66)	6 (1,89)	2 (0,73)	5 (2,17)	5 (3,33)	1 (1,14)	
		<b>T1</b>	<b>T1*</b>		0 (0,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	1 (1,14)
			<b>T1a</b>		7 (1,66)	8 (2,52)	2 (0,73)	7 (3,04)	5 (3,33)	1 (1,14)
		<b>T2</b>	<b>T2*</b>		2 (0,47)	5 (1,57)	1 (0,37)	4 (1,74)	1 (0,67)	1 (1,14)
			<b>T2b</b>		13 (3,08)	15 (4,72)	6 (2,21)	12 (5,22)	7 (4,67)	3 (3,41)
			<b>T2b4</b>		3 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,73)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)
	<b>T2c1b</b>		2 (0,47)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)		
	<b>T2e</b>		2 (0,47)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)		
<b>T2f1</b>		1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)			
<b>KU</b>	<b>K</b>	<b>K*</b>		1 (0,24)	2 (0,63)	1 (0,37)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>K1</b>	<b>K1a</b>		2 (0,47)	6 (1,89)	2 (0,73)	3 (1,30)	0 (0,0)	3 (3,41)

		<b>K1a1</b>	2 (0,47)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		<b>K1a1a</b>	0 (0,0)	4 (1,26)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	2 (2,27)	
		<b>K1a9</b>	0 (0,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>K1a11</b>	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>K1b1a1</b>	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
		<b>K1c</b>	4 (0,95)	0 (0,0)	3 (1,10)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
		<b>K2</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
	<b>U</b>	<b>U1</b>	<b>U1*</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>U1a1</b>			2 (0,47)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)	
<b>U1c</b>			0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>U2</b>	<b>U2*</b>	<b>U2e</b>	2 (0,47)	1 (0,31)	2 (0,73)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)
<b>U2e1</b>			9 (2,13)	1 (0,31)	4 (1,47)	1 (0,43)	5 (3,33)	0 (0,0)	
			3 (0,71)	1 (0,31)	3 (1,10)	1 (0,43)	1 (0,67)	0 (0,0)	
	<b>U3</b>	<b>U3*</b>	<b>U3a</b>	5 (1,18)	0 (0,0)	3 (1,10)	0 (0,0)	2 (1,33)	0 (0,0)
			2 (0,47)	0 (0,0)	2 (0,73)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>U4</b>	<b>U4*</b>	<b>U4a1</b>	2 (0,47)	5 (1,57)	2 (0,73)	4 (1,74)	0 (0,0)	1 (1,14)
<b>U4a1c</b>			4 (0,95)	3 (0,94)	3 (1,10)	1 (0,43)	1 (0,67)	2 (2,27)	
<b>U4a2</b>			1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U4a2a</b>			4 (0,95)	1 (0,31)	2 (0,73)	0 (0,0)	2 (1,33)	1 (1,14)	
<b>U4a2b</b>			3 (0,71)	3 (0,94)	1 (0,37)	3 (1,30)	2 (1,33)	0 (0,0)	
<b>U4a3</b>			0 (0,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U4b1b</b>			1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U4c1</b>			0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)	
			3 (0,71)	1 (0,31)	3 (1,10)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>U5</b>	<b>U5a</b>	<b>U5a1</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>U5a1b1</b>			12 (2,84)	21 (6,60)	11 (4,04)	16 (6,96)	1 (0,67)	5 (5,68)	
<b>U5a2</b>			4 (0,95)	0 (0,0)	2 (0,73)	0 (0,0)	2 (1,33)	0 (0,0)	
<b>U5a2a</b>			2 (0,47)	4 (1,26)	1 (0,37)	3 (1,30)	1 (0,67)	1 (1,14)	
<b>U5b</b>			6 (1,42)	1 (0,31)	4 (1,47)	0 (0,0)	2 (1,33)	1 (1,14)	
<b>U5b1a</b>			3 (0,71)	0 (0,0)	3 (1,10)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U5b1b</b>			0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,14)	
<b>U5b1c</b>			5 (1,18)	1 (0,31)	3 (1,10)	1 (0,43)	2 (1,33)	0 (0,0)	
<b>U5b2*</b>			1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U5b2a1</b>			1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U5b2a2</b>			0 (0,0)	4 (1,26)	0 (0,0)	4 (1,74)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>U5b2c</b>			0 (0,0)	4 (0,94)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	2 (2,27)	
			0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>U7</b>	<b>U8a1</b>	<b>U8b</b>	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
			2 (0,47)	2 (0,63)	1 (0,37)	1 (0,43)	1 (0,67)	1 (1,14)	
	<b>U8</b>	<b>U8a1</b>	<b>U8b</b>	0 (0,0)	2 (0,63)	0 (0,0)	2 (0,87)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>N</b>	<b>N1</b>	<b>N1a</b>	<b>N1a1</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)
			<b>N1b</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
				4 (0,95)	3 (0,94)	3 (1,10)	2 (0,87)	1 (0,67)	1 (1,14)
	<b>Y</b>	<b>Y1b</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<b>A</b>	<b>A8</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
<b>R</b>	<b>R2</b>	<b>R2*</b>	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	<b>R0</b>	<b>R0a</b>	0 (0,0)	1 (0,31)	0 (0,0)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)	

<b>M</b>	<b>C</b>	<b>C*</b>	1 (0,24)	0 (0,0)	1 (0,37)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	<b>D</b>	<b>D4/G</b>	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
	<b>M37</b>	<b>M37a</b>	1 (0,24)	1 (0,31)	1 (0,37)	1 (0,43)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>L2</b>			1 (0,24)	1 (0,31)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,67)	0 (0,0)
inne			0 (0,0)	3 (0,94)	0 (0,0)	3 (1,30)	0 (0,0)	0 (0,0)

\* oznacza pozostałe podhaplogrupy należące do danej haplogrupy, które nie zostały dotąd nazwane.

**Tabela S 13.** Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy częstości haplogrup H, J, K, T, U w grupie EOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Zastosowano dokładny dwustronny test Fishera.

Haplogrupa	p	OR	95% CI
<b>H</b>	0,435	0,75	0,40-1,40
<b>J</b>	0,805	1,17	0,46-2,94
<b>K</b>	0,728	1,23	0,34-4,39
<b>T</b>	0,628	0,70	0,24-2,05
<b>U</b>	0,343	1,46	0,73-2,92

**Tabela S 14.** Podstawienia nukleotydowe zidentyfikowane w regionie kontrolnym mtDNA osób badanych – chorych na EOAD, LOAD, w grupie kontrolnej - względem sekwencji referencyjnej (rCRS). Przedstawiono pozycję podstawień jednonukleotydowych oraz ich lokalizację w funkcjonalnych fragmentach regionu kontrolnego.

Pozycja w regionie kontrolnym	Podstawienie względem rCRS	Locus	Chorzy z EOAD, n	Chorzy z LOAD, n	Grupa kontrolna, n
3	T>C	7S DNA	0	0	1
55	T>C	7S DNA	0	1	0
57	T>C	7S DNA, HVSII	0	1	0
60	T>C	7S DNA, HVSII	0	0	1
64	C>T	7S DNA, HVSII	0	3	2
72	T>C	7S DNA, HVSII	0	16	9
73	A>G	7S DNA, HVSII	34	199	119
89	T>C	7S DNA, HVSII	0	0	3
93	A>G	7S DNA, HVSII	0	14	7
95	A>C	7S DNA, HVSII	0	1	0
114	C>T	7S DNA, OH, HVSII	0	5	1
119	T>C	7S DNA, OH, HVSII	0	1	0
131	T>C	7S DNA, OH, HVSII	1	0	0
143	G>A	7S DNA, OH, HVSII	0	2	1
146	T>C	7S DNA, OH, HVSII	1	29	17
150	C>T	7S DNA, OH, HVSII	5	33	29
151	C>T	7S DNA, OH, HVSII	1	6	4
152	T>C	7S DNA, OH, HVSII	10	96	56
153	A>G	7S DNA, OH, HVSII	0	3	3
185	G>A	7S DNA, OH, HVSII	4	22	23
186	C>A	7S DNA, OH, HVSII	0	1	2
188	A>G	7S DNA, OH, HVSII	1	7	7
189	A>G	7S DNA, OH, HVSII	1	13	6
193	A>G	7S DNA, OH, HVSII	0	1	0
194	C>T	7S DNA, OH, HVSII	1	10	5
195	T>C	7S DNA, OH, HVSII	9	74	66
196	T>C	7S DNA, OH, HVSII	0	1	0

198	C>T	7S DNA, OH, HVSII	1	1	2
199	T>C	7S DNA, OH, HVSII	2	14	8
200	A>G	7S DNA, OH, HVSII	2	2	4
203	G>A	7S DNA, OH, HVSII	0	1	1
204	T>C	7S DNA, OH, HVSII	3	25	12
207	G>A	OH, HVSII	2	17	8
210	A>G	OH, HVSII	0	1	0
211	A>G	OH, HVSII	0	1	1
214	A>G	OH, CSB1, HVSII	0	2	0
215	A>G	OH, CSB1, HVSII	0	3	3
217	T>C	OH, CSB1, HVSII	0	13	2
222	C>T	OH, CSB1, HVSII	0	1	2
225	G>A	OH, CSB1, HVSII	0	3	2
226	T>C	OH, CSB1, HVSII	0	3	1
227	A>G	OH, CSB1, HVSII	0	1	1
228	G>A	OH, CSB1, HVSII	2	18	21
235	A>G	OH, CSB1, HVSII	0	1	0
236	T>C	OH, HVSII	0	0	1
239	T>C	OH, TFX, HVSII	0	13	8
240	A>G	OH, TFX, HVSII	0	1	0
242	C>T	OH, TFX, HVSII	1	6	9
247	G>A	OH, TFX, HVSII	0	1	1
248	A>G	OH, TFX, HVSII	0	0	1
249	A>G	OH, TFX, HVSII	0	1	0
250	T>C	OH, TFX, HVSII	1	8	6
252	T>C	OH, TFX, HVSII	0	1	0
257	A>G	OH, TFX, HVSII	0	6	1
259	A>G	OH, TFX, HVSII	0	1	0
262	C>T	OH, TFX, HVSII	0	1	1
263	A>G	OH, TFX, HVSII	49	421	315
279	T>C	OH, TFX, HVSII	0	2	0
282	T>C	OH, TFX, HVSII	1	2	2
285	C>T	OH, TFX, HVSII	2	3	1
288	A>G	OH, TFX, HVSII	0	1	1
292	T>C	OH, TFX, HVSII	0	1	0
293	T>C	OH, TFX, HVSII	0	1	0
295	C>T	OH, TFX, HVSII	6	33	34
296	C>A	OH, TFX, HVSII	0	0	1
297	A>G	OH, TFX, HVSII	0	1	0
310	T>C	OH, TFX, HVSII	1	10	7
316	G>A	OH, TFX, HVSII	1	0	0
319	T>C	OH, TFX, HVSII	0	3	1
326	A>G	OH, TFX, HVSII	0	0	1
338	C>T	OH, TFX, HVSII	0	1	0
340	C>T	OH, TFX, HVSII	0	8	3
373	A>G	OH, mt4H, HVSII	0	1	0
385	A>G	OH, mt3H, HVSII	1	2	0
430	T>C	OH, PL, HVSII, miejsce wiązania mtTF1	0	2	0
453	T>C	HVSIII	1	0	0

456	C>T	HVSIII	0	24	13
461	C>T	HVSIII	0	1	0
462	C>T	HVSIII	4	26	31
477	T>C	HVSIII	2	27	15
482	T>C	HVSIII	0	3	4
489	T>C	HVSIII	7	35	35
497	C>T	HVSIII	2	4	14
499	G>A	HVSIII	1	18	15
507	T>C	HVSIII	0	1	0
508	A>G	HVSIII	0	13	3
511	C>T	HVSIII	1	0	0
513	G>A	HVSIII	0	6	2
515	A>G	HVSIII	0	0	1
516	C>T	HVSIII	0	1	1
533	A>G	HVSIII, miejsce wiązania mtTF1	0	1	0
538	A>G	HVSIII, miejsce wiązania mtTF1	0	1	1
560	C>T	HVSIII, PH1	0	2	0
16051	A>G	HVSI	0	17	7
16066	A>G	HVSI	0	0	2
16067	C>T	HVSI	0	1	2
16069	C>T	HVSI	6	33	34
16070	A>G	HVSI	0	1	0
16071	C>T	HVSI	0	0	1
16075	T>C	HVSI	0	3	1
16080	A>G	HVSI	0	5	0
16086	T>C	HVSI	0	2	1
16092	T>A	HVSI	1	10	4
16093	T>C	HVSI	2	22	17
16095	C>G	HVSI	1	0	0
16104	C>T	HVSI	0	1	0
16108	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16111	C>G	7S DNA, HVSI	0	1	0
16111	C>T	7S DNA, HVSI	0	3	1
16113	A>C	7S DNA, HVSI	0	1	0
16114	C>A	7S DNA, HVSI	1	1	0
16114	C>G	7S DNA, HVSI	0	4	3
16124	T>C	7S DNA, HVSI	0	0	1
16126	T>C	7S DNA, HVSI	10	71	72
16129	G>A	7S DNA, HVSI	3	16	13
16129	G>C	7S DNA, HVSI	0	14	3
16134	C>T	7S DNA, HVSI	0	4	3
16136	T>C	7S DNA, HVSI	0	0	1
16140	T>C	7S DNA, HVSI	1	2	2
16144	T>C	7S DNA, HVSI	0	0	4
16145	G>A	7S DNA, HVSI	1	13	14
16146	A>G	7S DNA, HVSI	1	3	2
16147	C>A	7S DNA, HVSI	0	2	0
16147	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16148	C>T	7S DNA, HVSI	0	2	2
16153	G>A	7S DNA, HVSI	0	10	7

16157	T>C	7S DNA, TAS, HVSI	0	2	0
16160	A>G	7S DNA, TAS, HVSI	0	1	0
16162	A>G	7S DNA, TAS, HVSI	1	2	6
16163	A>G	7S DNA, TAS, HVSI	0	7	10
16167	C>T	7S DNA, TAS, HVSI	1	1	1
16168	C>T	7S DNA, TAS, HVSI	0	0	1
16169	C>T	7S DNA, TAS, HVSI	0	0	1
16172	T>C	7S DNA, TAS, HVSI	1	13	14
16174	C>T	7S DNA, HVSI	0	2	0
16176	C>A	7S DNA, HVSI	0	4	3
16179	C>T	7S DNA, HVSI	0	4	2
16180	A>G	7S DNA, HVSI	1	0	0
16181	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	0
16182	A>C	7S DNA, HVSI	1	3	2
16183	A>C	7S DNA, HVSI	2	24	14
16184	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	0
16185	C>T	7S DNA, HVSI	0	0	2
16186	C>T	7S DNA, HVSI	0	7	10
16188	C>G	7S DNA, HVSI	0	1	1
16188	C>T	7S DNA, HVSI	0	2	0
16189	T>A	7S DNA, HVSI	0	0	1
16189	T>C	7S DNA, HVSI	5	67	55
16192	C>T	7S DNA, HVSI	5	31	29
16193	C>T	7S DNA, HVSI	2	4	3
16195	T>C	7S DNA, mt5, HVSI	0	1	0
16209	T>C	7S DNA, HVSI	0	8	5
16212	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	0
16214	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16216	A>G	7S DNA, HVSI	0	2	2
16218	C>T	7S DNA, HVSI	0	0	2
16221	C>T	7S DNA, HVSI	1	2	0
16222	C>T	7S DNA, HVSI	0	5	5
16223	C>T	7S DNA, HVSI	5	35	22
16224	T>C	7S DNA, HVSI	3	11	19
16227	A>G	7S DNA, HVSI	1	1	0
16230	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	0
16231	T>C	7S DNA, HVSI	0	4	1
16234	C>T	7S DNA, HVSI	1	5	5
16235	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	1
16239	C>T	7S DNA, HVSI	0	2	1
16240	A>G	7S DNA, HVSI	0	0	1
16241	A>T	7S DNA, HVSI	0	0	1
16245	C>T	7S DNA, HVSI	1	0	1
16247	A>G	7S DNA, HVSI	2	1	0
16248	C>T	7S DNA, HVSI	1	3	1
16249	T>C	7S DNA, HVSI	2	3	4
16255	G>A	7S DNA, HVSI	0	0	2
16256	C>T	7S DNA, HVSI	7	31	28
16257	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16258	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	0



16260	C>T	7S DNA, HVSI	0	0	3
16261	C>T	7S DNA, HVSI	3	12	14
16262	C>T	7S DNA, HVSI	1	0	0
16263	T>C	7S DNA, HVSI	0	2	1
16264	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16265	A>G	7S DNA, HVSI	1	4	3
16266	C>A	7S DNA, HVSI	0	1	0
16266	C>T	7S DNA, HVSI	0	5	1
16269	A>G	7S DNA, HVSI	1	0	0
16270	C>T	7S DNA, HVSI	8	34	35
16271	T>C	7S DNA, HVSI	0	0	1
16272	A>G	7S DNA, HVSI	0	2	2
16274	G>A	7S DNA, HVSI	0	3	4
16278	C>T	7S DNA, HVSI	3	14	11
16284	A>G	7S DNA, HVSI	0	0	1
16286	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	0
16287	C>A	7S DNA, HVSI	0	1	0
16288	T>C	7S DNA, HVSI	0	2	0
16289	A>G	7S DNA, HVSI	0	0	1
16290	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	1
16291	C>T	7S DNA, HVSI	4	9	10
16292	C>T	7S DNA, HVSI	1	20	8
16293	A>G	7S DNA, HVSI	2	9	9
16294	C>T	7S DNA, HVSI	6	48	40
16295	C>A	7S DNA, HVSI	0	3	0
16296	C>T	7S DNA, HVSI	3	21	21
16297	T>C	7S DNA, HVSI	1	0	1
16298	T>C	7S DNA, HVSI	1	21	11
16299	A>G	7S DNA, HVSI	1	2	0
16300	A>G	7S DNA, HVSI	0	0	2
16302	A>G	7S DNA, HVSI	0	0	1
16304	T>C	7S DNA, HVSI	3	42	30
16309	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	2
16310	G>A	7S DNA, HVSI	1	0	2
16311	T>C	7S DNA, HVSI	6	52	47
16316	A>G	7S DNA, HVSI	0	1	0
16318	A>T	7S DNA, HVSI	1	0	1
16319	G>A	7S DNA, HVSI	0	4	1
16320	C>T	7S DNA, HVSI	1	5	3
16324	T>C	7S DNA, HVSI	1	3	2
16325	T>C	7S DNA, HVSI	1	3	3
16327	C>T	7S DNA, HVSI	1	2	1
16335	A>G	7S DNA, HVSI	0	2	0
16342	T>C	7S DNA, HVSI	0	2	2
16343	A>G	7S DNA, HVSI	0	9	0
16344	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	0
16354	C>T	7S DNA, HVSI	1	7	5
16355	C>T	7S DNA, HVSI	0	4	1
16356	T>C	7S DNA, HVSI	1	32	23
16357	T>C	7S DNA, HVSI	0	2	0

16360	C>T	7S DNA, HVSI	0	3	0
16362	T>C	7S DNA, HVSI	2	36	24
16366	C>T	7S DNA, HVSI	0	1	0
16368	T>C	7S DNA, HVSI	0	2	1
16380	C>T	7S DNA, HVSI	0	0	1
16390	G>A	7S DNA	0	10	5
16391	G>A	7S DNA	1	8	6
16398	G>A	7S DNA	0	1	1
16399	A>G	7S DNA	3	17	21
16400	C>T	7S DNA	0	1	1
16456	G>A	7S DNA	0	1	2
16465	C>T	7S DNA	0	1	2
16482	A>G	7S DNA	0	8	8
16483	G>A	7S DNA	0	1	0
16497	A>G	7S DNA	1	1	0
16519	T>C	7S DNA	31	263	206
16526	G>A	7S DNA	3	11	9
16527	C>T	7S DNA	0	1	2

\* HVSI-III- region hiperzmienny I-III; mtTF1, TFX- miejsca wiązania mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego, OH - miejsce początku syntezy nici H; CSB1-3 (*Conserved sequence block 1-3*); mt3H, mt4H, mt5H – elementy regulatorowe na nici H; PL – promotor nici L; TAS – *termination associated sequence*, sekwencja regulatorowa ważna dla terminacji replikacji; PH1 – główny promotor nici H.

**Tabela S 15.** Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs1937 u chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

<i>TFAM</i> rs1937 c.35G>C	Chorzy z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	Kobiety z LOAD, n (%)	Kobiety-grupa kontrolna, n (%)	Mężczyźni z LOAD, n (%)	Mężczyźni – grupa kontrolna, n (%)
<b>Genotypy</b>						
<b>GG</b>	339 (80,33)	250 (78,62)	214 (78,68)	184 (80,00)	125 (83,33)	66 (75,00)
<b>GC</b>	75 (17,77)	65 (20,44)	51 (18,75)	44 (19,13)	24 (16,00)	21 (23,86)
<b>CC</b>	8 (1,90)	3 (0,94)	7 (2,57)	2 (0,87)	1 (0,67)	1 (1,14)
<b>test <math>\chi^2</math> GG vs GC+CC*</b>	$\chi^2=1,86$ , df=2, p=0,395 p=0,567 (OR=1,11, 95% CI 0,78-1,59)		$\chi^2=2,06$ , df=2, p=0,358 p=0,715 (OR=0,92, 95% CI 0,60-1,42)		$\chi^2=2,44$ , df=2, p=0,295 p=0,087 (OR=1,74, 95% CI 0,92-3,29)	
<b>Allele</b>						
<b>G</b>	753 (89,22)	565 (88,84)	479 (88,05)	412 (89,56)	274 (91,33)	153 (86,93)
<b>C</b>	91 (10,78)	71 (11,16)	65 (11,95)	48 (10,44)	26 (8,67)	23 (13,07)
<b>test <math>\chi^2</math></b>	p=0,816 (OR=1,04, 95% CI 0,75-1,44)		p=0,450 (OR=0,86, 95% CI 0,58-1,27)		p=0,127 (OR=1,58, 95% CI 0,88-2,85)	

\* test  $\chi^2$  sprawdzający asocjację genotypów polimorfizmu rs1937, GG vs. GC+CC. Z uwagi na niską częstość genotypu CC dla celów analizy statystycznej połączono go z genotypem GC.

**Tabela S 16.** Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs1937 u chorych na EOAD w porównaniu z grupą kontrolną.

<i>TFAM</i> , rs1937 (c.35G>C)	Chorzy na EOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)
<b>Genotypy</b>		
<b>GG</b>	35 (71,43)	250 (78,62)
<b>GC</b>	12 (24,49)	65 (20,44)
<b>CC</b>	2 (4,08)	3 (0,94)
<b>Test <math>\chi^2</math> (df=2)</b>	p=0,158	
<b>GG vs GC+CC*</b>	p=0,261 (OR=0,68, 95% CI 0,35-1,34)	
<b>Allele</b>		
<b>G</b>	82 (83,67)	565 (88,84)
<b>C</b>	16 (16,33)	71 (11,16)
<b>Test <math>\chi^2</math> (df=1)</b>	p=0,141	

\* test  $\chi^2$  sprawdzający asocjację genotypów polimorfizmu rs1937, GG vs. GC+CC. Z uwagi na niską częstość genotypu CC dla celów analizy statystycznej połączono go z genotypem GC.

**Tabela S 17.** Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) genu *PGC-1 $\alpha$*  w grupie EOAD w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza statystyczna została wykonana z zastosowaniem testu  $\chi^2$  lub dwustronnego dokładnego testu Fishera.

<i>PGC-1<math>\alpha</math></i> , c.1444C>T	EOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)
<b>Genotypy</b>		
<b>CC</b>	24 (48,98)	168 (52,83)
<b>CT</b>	23 (46,94)	119 (37,42)
<b>TT</b>	2 (4,08)	31 (9,75)
<b>Test <math>\chi^2</math> (df=2)</b>	p=0,268	
<b>CT vs. CC+TT*</b>	p=0,211 [OR=1,48, 95% CI 0,81-2,71]	
<b>TT vs. CC+CT*</b>	p=0,284 [OR=0,39, 95% CI 0,09-1,70]	
<b>TT+CT vs. CC*</b>	p=0,647 [OR=1,17, 95% CI 0,64-2,13]	
<b>Allele</b>		
<b>C</b>	71 (72,45)	455 (71,54)
<b>T</b>	27 (27,55)	181 (28,45)
<b>Test <math>\chi^2</math> (df=1)</b>	p=0,905	

**Tabela S 18.** Zestawienie częstości występowania alleli polimorfizmu His63Asp w grupach LOAD, EOAD, MCI oraz w grupie kontrolnej (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

Badani	His63Asp (C187G, rs1799945)						
	C	G	C vs. G	CC	CG	GG	CC vs. CG+GG
<b>Chorzy z LOAD</b>	705 (83,53)	139 (16,47)	$\chi^2=3,02$ , df=1,	296 (70,14)	113 (26,78)	13 (3,08)	$\chi^2=2,28$ , df=1,
<b>Grupa kontrolna</b>	552 (86,79)	84 (13,21)	p=0,082	239 (75,16)	74 (23,27)	5 (1,57)	p=0,131
<b>Kobiety z LOAD</b>	465 (85,48)	79 (14,52)	$\chi^2=0,60$ , df=1,	199 (73,16)	67 (24,63)	6 (2,21)	$\chi^2=1,20$ , df=1,
<b>Kobiety z grupy kontrolnej</b>	401 (87,17)	59 (12,83)	p=0,437	175 (76,09)	51 (22,17)	4 (1,74)	p=0,272
<b>Mężczyźni z LOAD</b>	240 (80,0)	60 (20,0)	$\chi^2=2,54$ , df=1,	97 (64,67)	46 (30,67)	7 (4,66)	$\chi^2=1,65$ , df=1,
<b>Mężczyźni z grupy kontrolnej</b>	151 (85,80)	25 (14,20)	p=0,111	64 (72,73)	23 (26,14)	1 (1,14)	p=0,199
<b>Chorzy na EOAD vs. grupa kontrolna</b>	82 (83,67)	16 (16,33)	$\chi^2=0,70$ , df=1,	33 (67,35)	16 (32,65)	0 (0)	$\chi^2=1,35$ , df=1,
<b>MCI vs grupa kontrolna</b>	179 (85,24)	31 (14,76)	p=0,402	76 (72,38)	29 (27,62)	0 (0)	$\chi^2=0,32$ , df=1,
<b>Kobiety (MCI) vs kobiety z grupy kontrolnej</b>	117 (82,39)	25 (17,61)	$\chi^2=2,06$ , df=1,	49 (69,01)	19 (26,76)	3 (4,22)	$\chi^2=2,07$ , df=1,
<b>Mężczyźni (MCI) vs mężczyźni z grupy kontrolne</b>	62 (91,18)	6 (8,82%)	p=0,151	28 (82,35)	6 (17,65)	0 (0)	$\chi^2=1,22$ , df=1,
<b>MCI &gt; LOAD</b>	43 (93,48)	3 (6,52)	p=0,258	20 (86,96)	3 (13,04)	0 (0)	p=0,268
<b>MCI nieskonwertowane do LOAD<sup>a</sup></b>	127 (82,46)	27 (17,54)	p=0,097 <sup>b</sup>	53 (68,83)	21 (27,27)	3 (3,90)	p=0,111 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Nie uwzględniono osób, które rozwinęły inne choroby neurologiczne poza AD (n=5).

<sup>b</sup> dokładny dwustronny test Fishera

**Tabela S 19.** Związek polimorfizmu His63Asp i statusu *APOE4* w ryzyku LOAD.

<i>APOE4</i>	His63Asp	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	<i>p</i>
<b>Wszyscy <i>APOE4-</i></b>	wt	131 (72,37)	192 (75,60)	0,450
	His63Asp	50 (27,62)	62 (24,40)	
<b><i>APOE4+</i></b>	wt	165 (68,46)	47 (73,43)	0,442
	His63Asp	76 (31,54)	17 (26,56)	
<b>Kobiety <i>APOE4-</i></b>	wt	90 (74,38)	137 (73,66)	0,888
	His63Asp	31 (25,62)	49 (26,34)	
<b><i>APOE4+</i></b>	wt	109 (72,18)	38 (88,36)	0,072
	His63Asp	42 (27,82)	6 (13,64)	
<b>Mężczyźni <i>APOE4-</i></b>	wt	41 (68,33)	55 (80,88)	0,102
	His63Asp	19 (31,67)	13 (19,12)	
<b><i>APOE4+</i></b>	wt	56 (62,22)	9 (45,0)	0,156
	His63Asp	34 (37,78)	11(55,0)	

**Tabela S 20.** Zestawienie częstości występowania alleli polimorfizmu Cys282Tyr w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

Badani	Cys282Tyr (G845A)						
	G	A	G vs. A	GG	GA	AA	GG vs. GA+AA
<b>Chorzy z LOAD</b>	810 (96,20)	32 (3,80)	p=0,979	391 (92,87)	28 (6,66)	2 (0,47)	p=0,828
<b>Grupa kontrolna</b>	612 (96,23)	24 (3,77)		294 (92,45)	24 (7,55)	0 (0)	
<b>Kobiety z LOAD</b>	522 (95,96)	22 (4,04)	p=0,640	252 (92,65)	18 (6,62)	2 (0,73)	p=0,864
<b>Kobiety z grupy kontrolnej</b>	444 (96,52)	16 (3,48)		214 (93,04)	16 (6,96)	0 (0)	
<b>Mężczyźni z LOAD</b>	288 (96,64)	10 (3,36)	p=0,513	139 (93,29)	10 (6,71)	0 (0)	p=0,504
<b>Mężczyźni z grupy kontrolnej</b>	168 (95,45)	8 (4,65)		80 (90,91)	8 (9,09)	0 (0)	
<b>MCI vs grupa kontrolna</b>	200 (95,24)	10 (4,76)	p=0,544	95 (90,48)	10 (9,52)	0 (0)	p=0,536
<b>Kobiety (MCI) vs kobiety z grupy kontrolnej</b>	137 (96,48)	5 (3,52)	p=1,0	66 (92,95)	5 (7,05)	0 (0)	p=1,0
<b>Mężczyźni (MCI) vs mężczyźni z grupy kontrolnej</b>	63 (92,64)	5 (7,36)	p=0,360	29 (85,29)	5 (14,71)	0 (0)	p=0,349
<b>MCI skonwertowane do LOAD</b>	42 (91,30)	4 (8,70)	p=0,084	19 (82,61)	4 (17,39)	0 (0)	p=0,079
<b>MCI nieskonwertowane do LOAD*</b>	150 (97,40)	4 (2,60)		73 (94,80)	4 (5,20)	0 (0)	

**Tabela S 21.** Związek pomiędzy nosicielstwem polimorfizmu C282Y i statusem *APOE4* a LOAD.

APOE4	Cys282Tyr	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	p
<b>Wszyscy APOE4-</b>	wt	166 (92,22)	237 (93,31)	0,665
	Cys282Tyr	14 (7,78)	17 (6,69)	
<b>APOE4+</b>	wt	225 (93,36)	57 (89,06)	0,247
	Cys282Tyr	16 (6,64)	7 (10,94)	
<b>Kobiety APOE4-</b>	wt	112 (92,56)	175 (94,09)	0,597
	Cys282Tyr	9 (7,44)	11 (5,91)	
<b>APOE4+</b>	wt	140 (92,71)	39 (88,64)	0,386
	Cys282Tyr	11 (7,29)	5 (11,36)	
<b>Mężczyźni APOE4-</b>	wt	54 (91,52)	62 (91,18)	0,944
	Cys282Tyr	5 (8,48)	6 (8,82)	
<b>APOE4+</b>	wt	85 (94,44)	18 (90,0)	0,609
	Cys282Tyr	5 (5,56)	2 (10,0)	

**Tabela S 22.** Związek pomiędzy nosicielstwem genotypów polimorfizmów His63Asp, Cys282Tyr i statusem *APOE4* a LOAD.

<i>APOE4</i>	His63Asp/Cys282Tyr	LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	<i>p</i>
<b>Wszyscy</b> <i>APOE4-</i>	wt/wt	121 (67,22)	178 (70,08)	0,527
	His63Asp/Cys282Tyr	59 (32,78)	76 (29,92)	
<i>APOE4+</i>	wt/wt	151 (62,65)	42 (65,62)	0,661
	His63Asp/Cys282Tyr	90 (37,35)	22 (34,38)	
<b>Kobiety</b> <i>APOE4-</i>	wt/wt	82 (67,77)	129 (69,35)	0,770
	His63Asp/Cys282Tyr	39 (32,23)	57 (30,65)	
<i>APOE4+</i>	wt/wt	99 (65,56)	33 (75,00)	0,239
	His63Asp/Cys282Tyr	52 (34,44)	11 (25,00)	
<b>Mężczyźni</b> <i>APOE4-</i>	wt/wt	39 (66,10)	49 (80,88)	0,468
	His63Asp/Cys282Tyr	20 (33,90)	19 (19,12)	
<i>APOE4+</i>	wt/wt	52 (57,78)	9 (45,0)	0,298
	His63Asp/Cys282Tyr	38 (42,22)	11(55,0)	

His63Asp / Cys282Tyr - homozygotyczność pod względem allelu 63Asp, 282Tyr lub heterozygotyczność pod względem jednego lub każdego z nich  
wt/wt - nosicielstwo dzikich genotypów – His63 oraz Cys282

**Tabela S 23.** Zestawienie kombinacji genotypów tworzonych przez polimorfizmy His63Asp (rs1799945) oraz Cys282Tyr (rs1800562) w genie *HFE* w grupie LOAD i w grupie kontrolnej. Najrzadszy haplotyp, G<sub>rs1799945</sub>A<sub>rs1800562</sub> nie został uwzględniony w zestawieniu z uwagi na swoją niską częstość występowania w całej grupie (0,1%).

	Częstość (%)	LOAD (%)	K (%)	Test $\chi^2$
<b>Wszyscy badani</b>				
C <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	81,2	79,8	83,0	p=0,118
G <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	15,0	16,4	13,2	p=0,090
C <sub>rs1799945</sub> A <sub>rs1800562</sub>	3,8	3,8	3,8	p=0,979
<b>Kobiety</b>				
C <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	82,5	81,4	83,7	p=0,348
G <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	13,7	14,5	12,8	p=0,437
C <sub>rs1799945</sub> A <sub>rs1800562</sub>	3,8	4,0	3,5	p=0,640
<b>Mężczyźni</b>				
C <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	79,0	77,4	81,8	p=0,265
G <sub>rs1799945</sub> G <sub>rs1800562</sub>	17,2	19,2	13,7	p=0,125
C <sub>rs1799945</sub> A <sub>rs1800562</sub>	3,2	2,8	4,0	p=0,446

**Tabela S 24.** Porównanie częstości występowania haplotypów złożonych z alleli polimorfizmów His63Asp i Cys282Tyr w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej. W zestawieniu uwzględniono nosicielstwo genotypu prawidłowego (wt, czyli His63 oraz Cys282) oraz nosicielstwo przynajmniej jednego allelu zmutowanego (His63Asp, Cys282Tyr) (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

Haplotyp His63Asp / Cys282Tyr	Chorzy z LOAD, n (%)	Grupa kontrolna, n (%)	p
<b>Wszyscy badani</b>			
His63Asp / Cys282Tyr	5 (1,19)	5 (1,57)	p=1,0*
wt / wt	272 (64,77)	220 (69,18)	p= 0,192
wt / Cys282Tyr	24 (5,71)	19 (5,97)	p=0,875
His63Asp / wt	119 (28,33)	74 (23,28)	p=0,126
<b>Kobiety</b>			
His63Asp / Cys282Tyr	2 (0,73)	3 (1,30)	p=0,665*
wt / wt	181 (66,55)	162 (70,44)	p= 0,350
wt / Cys282Tyr	18 (6,62)	13 (5,65)	p= 0,654
His63Asp / wt	71 (26,10)	52 (22,61)	p= 0,364
<b>Mężczyźni</b>			
His63Asp / Cys282Tyr	4 (2,68)	2 (2,27)	p=1,00*
wt / wt	91 (61,07)	58 (65,91)	p=0,457
wt / Cys282Tyr	6 (4,03)	6 (6,82)	p=0,344
His63Asp / wt	48 (32,22)	22 (25,0)	p=0,239

\* dokładny dwustronny test Fishera

**Tabela S 25.** Częstości haplotypów polimorfizmów rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2233682, rs2233683, rs2010457 genu *PIN1* w grupie chorych z LOAD i EOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).

Grupa badana	K (%)	LOAD	LOAD vs. K	EOAD	EOAD vs. K
Haplotyp*		(%)	p	(%)	p
CGTGCA	68,7	67,1	0,717	64,3	0,438
GGCGCG	17,8	17,6	0,951	18,4	0,902
CCCGCG	8,7	9,9	0,654	15,3	0,080
CGTGCG	1,0	0,9	0,948	0,0	0,333
CCCGTA	1,0	2,3	0,294	0,0	0,329
GGCGCA	1,0	0,0	0,149	1,0	0,962
CCCGTG	0,9	0,9	0,954	0,0	0,331
CGCACA	0,5	0,5	0,963	1,0	0,585
CCCGCA	0,5	0,0	0,303	0,0	0,495
CGCGCA	0,0	0,5	0,332	0,0	-
GCCGCG	0,0	0,5	0,332	0,0	-

\* W haplotypach występują kolejno allele polimorfizmów rs4804459, rs2233678, rs2233679, rs2233682, rs2233683, rs2010457.





## 9 SPIS RYCIN

<b>Ryc. 1.</b> Postacie choroby Alzheimer (AD) wraz ze znanymi czynnikami genetycznymi wpływającymi na zachorowanie.....	6
<b>Ryc. 2.</b> Dysfunkcja mitochondriów w chorobie Alzheimer ..... 12	12
<b>Ryc. 3.</b> Schemat organizacji mitochondrialnego DNA (mtDNA) z zaznaczonym regionem kontrolnym oraz sekwencjami kodującymi geny oraz tRNA i rRNA mitochondrialne.....	14
<b>Ryc. 4.</b> Fragment drzewa filogenetycznego mitochondrialnych haplogrup, występujących w populacji kaukaskiej (na podstawie van Oven i Kayser, 2008).....	17
<b>Ryc. 5.</b> PGC-1 $\alpha$ jest nadrzędnym regulatorem replikacji mtDNA i ekspresji genów mitochondrialnych. ....	23
<b>Ryc. 6.</b> Udział dysfunkcji PIN1 w chorobie Alzheimer. ....	26
<b>Ryc. 7.</b> Schemat podsumowujący badane czynniki genetyczne w chorobie Alzheimer – zmienność mtDNA, PGC-1 $\alpha$ (Gly482Ser), TFAM (rs1937, rs2306604), HFE (His63Asp oraz Cys282Tyr), APOE4, zmienność genu PIN1 .....	29
<b>Ryc. 8.</b> Schemat rozmieszczenia starterów (RK1-RK6) i tworzonych przez nie amplikonów, służących do amplifikacji preparatów DNA, które nie poddały się standardowej amplifikacji z udziałem starterów F15997 i R649, także pokazanych na rycinie. ....	35
<b>Ryc. 9.</b> Zakres amplifikowanych fragmentów regionu kontrolnego mtDNA .....	38
<b>Ryc. 10.</b> Schemat miejsc trawienia enzymu Hin6I w zamplifikowanym fragmencie genu APOE. ....	39
<b>Ryc. 11.</b> Główne etapy analizy badanych fragmentów genomu mitochondrialnego i jądrowego.....	46
<b>Ryc. 12.</b> Przykładowy wynik genotypowania z zastosowaniem techniki TaqMan .....	50
<b>Ryc. 13.</b> Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie chorych z EOAD (N=49), LOAD (N=422) oraz w grupie kontrolnej (N=318).. ..	51
<b>Ryc. 14.</b> Wyniki wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (status APOE4, płeć, wiek, nosicielstwo haplogrupy H), przeprowadzonej w grupach LOAD i kontrolnej, z których wykluczono nosicieli niespecyficznych dla populacji kaukaskiej haplogrup.....	53
<b>Ryc. 15.</b> Metaanaliza związku haplogrupy H z ryzykiem AD w sześciu badaniach, włącznie z opisywanym w niniejszej rozprawie (Maruszak i wsp., w druku). ....	53
<b>Ryc. 16.</b> Wykres typu ramka-wąsy przedstawiający wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD u nosicieli różnych mitochondrialnych haplogrup, charakterystycznych dla populacji kaukaskiej.....	54
<b>Ryc. 17.</b> Wyniki analizy wieloczynnikowej regresji logistycznej uwzględniającej zmienne: płeć, wiek, status APOE4 oraz nosicielstwo klastra HV .....	58
<b>Ryc. 18.</b> Wynik metaanalizy związku klastra HV z zachorowaniem na chorobę Alzheimer (A) siedmiu i B) sześciu badaniach, włącznie z opisywanym w niniejszej rozprawie (Maruszak i wsp. w druku). ....	59
<b>Ryc. 19.</b> Częstości mitochondrialnych haplogrup u osób z diagnozą łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI), które rozwinęły LOAD (MCI>LOAD) w porównaniu z tymi, którzy pozostają nadal w stadium MCI. ....	60
<b>Ryc. 20.</b> Porównanie długości okresu, jaki upłynął od postawienia diagnozy łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI) do rozwinięcia LOAD u nosicieli haplogrupy H i U. ....	61
<b>Ryc. 21.</b> Częstość występowania LOAD u stulatków obu płci. ....	62
<b>Ryc. 22.</b> Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stuletnich kobiet chorych na LOAD oraz u kobiet z grupy kontrolnej. ....	62
<b>Ryc. 23.</b> Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stuletnich mężczyzn z LOAD oraz u mężczyzn z grupy kontrolnej. ....	63
<b>Ryc. 24.</b> Częstości haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej w grupie stulatków w porównaniu z grupą kontrolną.....	63
<b>Ryc. 25.</b> Zestawienie częstości (%) podhaplogrup H, zaobserwowanych w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej. Podhaplogrupa H5 została określona na rycinie jako H5'36 wg nazewnictwa bazy danych Phylotree.org. ....	65
<b>Ryc. 26.</b> Heteroplazmia w pozycji m.16093. ....	68
<b>Ryc. 27.</b> Graficzne przedstawienie wyników analizy MDR. Kolorem ciemnoszarym MDR zaznacza genotypy o wysokim ryzyku, kolorem jasnoszarym – o niskim ryzyku zachorowania na LOAD.....	73
<b>Ryc. 28.</b> Graficzne przedstawienie wyników analizy MDR po włączeniu polimorfizmów regionu kontrolnego mtDNA .....	74
<b>Ryc. 29.</b> Wynik wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej (polimorfizm c.1444C>T (Gly482Ser), płeć oraz status APOE4) przeprowadzonej w grupie osób, które rozwinęły AD po stadium MCI w porównaniu z tymi, którzy znajdują się nadal w stadium MCI. ....	80
<b>Ryc. 30.</b> Wynik zastosowania programu ESEfinder dla c.1444C>T.....	81
<b>Ryc. 31.</b> Zestawienie 18 polimorfizmów w analizowanej sekwencji genu PIN1 oraz jego regionu promotorowego. ....	83
<b>Ryc. 32.</b> Przedstawienie nierównowagi sprzężeń pomiędzy 6 polimorfizmami znajdującymi się na odcinku o długości 14 kb w genie PIN1.....	83

<b>Ryc. 33.</b> <i>PINI</i> z zaznaczonymi pozycjami zidentyfikowanych mutacji u chorych z EOAD i LOAD. ....	<b>85</b>
<b>Ryc. 34.</b> Wpływ substytucji c.24G>T na przyłączanie się eksonowych czynników wzmacniających splicing na podstawie analizy podstawienia z wykorzystaniem programu ESEfinder.....	<b>87</b>
<b>Ryc. 35.</b> Porównanie fragmentu sekwencji <i>PINI</i> z zaznaczonym na pomarańczowo miejscem, w którym zaszło podstawienie c.58+64C>T.....	<b>87</b>
<b>Ryc. 36.</b> Względny poziom ekspresji <i>PINI</i> u nosicielki wariantu c.58+64C>T oraz w grupie kontrolnej. ....	<b>88</b>
<b>Ryc. 37.</b> Schematyczne przedstawienie konsekwencji sprzęgania (A) i częściowego rozprzęgania (B) fosforylacji oksydacyjnej oraz hierarchii haplogrup powiązanych z fenotypem sprzęgania (góra piramidy) i częściowego rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej (C) (na podstawie Wallace i wsp., 2003). ....	<b>94</b>
<b>Ryc. 38.</b> Podsumowanie stwierdzonych czynników ryzyka LOAD oraz czynników protekcyjnych w badaniach opisanych w rozprawie. ....	<b>104</b>

## 10 SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Związek polimorfizmów mtDNA, haplogrup mitochondrialnych oraz tworzonych przez nie klasterów z ryzykiem choroby Alzheimera (LOAD) w populacji kaukaskiej. ....	18
<b>Tabela 2.</b> Polimorfizmy w mtDNA, uczestniczące w tworzeniu fenotypu częściowego rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej wg Montiel-Sosa i wsp., 2006, Khusnutdinova i wsp., 2008; Ruiz-Pesini i wsp., 2004.....	20
<b>Tabela 3.</b> Charakterystyka badanych grup.....	33
<b>Tabela 4.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji techniką PCR. ....	35
<b>Tabela 5.</b> Częstości genotypów i alleli <i>APOE</i> w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej. ....	47
<b>Tabela 6.</b> Porównanie liczby nosicieli allelu ryzyka LOAD, <i>APOE4</i> , w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej, podzielonych ze względu na płeć. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Uśredniony wiek wystąpienia pierwszych objawów LOAD a nosicielstwo allelu <i>APOE4</i> (status <i>APOE4+</i> vs status <i>APOE4-</i> ). ....	48
<b>Tabela 8.</b> Udział nosicielstwa allelu <i>APOE4</i> w zachorowaniu na LOAD w całej grupie badanej podzielonej według wieku. ....	49
<b>Tabela 9.</b> Udział wieku oraz nosicielstwa allelu <i>APOE4</i> w zachorowaniu na LOAD w grupie kobiet ..... 49	49
<b>Tabela 10.</b> Udział allelu <i>APOE4</i> w zachorowaniu na LOAD w grupie mężczyzn podzielonych według wieku. ....	49
<b>Tabela 11.</b> Zestawienie polimorfizmów regionu kodującego mtDNA do oznaczania charakterystycznych dla populacji kaukaskiej haplogrup mitochondrialnych. ....	50
<b>Tabela 12.</b> Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy związku głównych haplogrup charakterystycznych dla populacji kaukaskiej z ryzykiem LOAD w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. ....	52
<b>Tabela 13.</b> Częstości mitochondrialnych haplogrup u nosicieli allelu <i>APOE4</i> (status <i>APOE4+</i> ) oraz u osób o statusie <i>APOE4-</i> w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K). ....	55
<b>Tabela 14.</b> Wpływ nosicielstwa poszczególnych haplogrup mitochondrialnych na oddziaływanie allelu <i>APOE4</i> na ryzyko LOAD. ....	56
<b>Tabela 15.</b> Wyniki jednoczynnikowej analizy częstości polimorfizmów w regionie kodującym mtDNA w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną, także po podzieleniu badanych ze względu na płeć. ....	56
<b>Tabela 16.</b> Wyniki analizy regresji logistycznej, uwzględniającej zmienne niezależne: status <i>APOE4</i> (+/-), płeć, wiek oraz polimorfizm w regionie kodującym mtDNA. ....	57
<b>Tabela 17.</b> Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy (test $\chi^2$ lub dwustronny dokładny test Fishera) dla klasterów haplogrup w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. ....	57
<b>Tabela 18.</b> Zestawienie wyników wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej ryzyka LOAD, w której poza przynależnością do odpowiedniego klastra haplogrup uwzględniono jako zmienne niezależne także wiek zachorowania/badania (w przypadku osób z grupy kontrolnej), nosicielstwo allelu <i>APOE4</i> oraz płeć badanych. ....	58
<b>Tabela 19.</b> Analiza synergii pomiędzy podhaplogrupą H5 a statusem <i>APOE4</i> . ....	66
<b>Tabela 20.</b> Zestawienie wyników jednoczynnikowej analizy częstości haplogrup i podhaplogrup wiązanych z częściowym rozprzęganiem fosforylacji oksydacyjnej w grupie chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną oraz po podzieleniu badanych ze względu na płeć (test $\chi^2$ , dwustronny dokładny test Fishera). ....	66
<b>Tabela 21.</b> Zestawienie wyników wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej, która obejmowała zmienne: płeć, wiek zachorowania, nosicielstwo allelu <i>APOE4</i> oraz zagregowane haplogrupy i podhaplogrupy o postulowanej funkcji w częściowym rozprzęganiu fosforylacji oksydacyjnej. ....	67
<b>Tabela 22.</b> Porównanie częstości występowania insercji i delekcji w regionie kontrolnym mtDNA w grupie chorych na LOAD, EOAD i w grupie kontrolnej. ....	68
<b>Tabela 23.</b> Zestawienie jednonukleotydowych zmian heteroplazmatycznych, zaobserwowanych w regionie kontrolnym u chorych z LOAD, EOAD i w grupie kontrolnej. ....	69
<b>Tabela 24.</b> Zidentyfikowane nowe warianty w regionie kontrolnym mtDNA, nieopisane w bazach danych (MITOMAP, Human Mitochondrial Genome database). ....	69
<b>Tabela 25.</b> Zestawienie wyników jedno- i wieloczynnikowej analizy znaczenia polimorfizmów regionu kontrolnego (RK), 217T>C, 242C>T, 497C>T, 16126T>C, 16343A>G, 16129G>C oraz 16224T>C, w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. ....	70
<b>Tabela 26.</b> Częstości genotypów rs1937 u nosicieli allelu <i>APOE4</i> (status <i>APOE4+</i> ) oraz u osób pozbawionych <i>APOE4+</i> (status <i>APOE4-</i> ) w grupie chorych na LOAD w porównaniu z grupą kontrolną.....	71
<b>Tabela 27.</b> Częstość genotypów polimorfizmu rs1937 u chorych na LOAD kobiet i mężczyzn w porównaniu z grupą kontrolną (K), podzielonych ze względu na nosicielstwo allelu <i>APOE4</i> . ....	72
<b>Tabela 28.</b> Wyniki analizy regresji logistycznej (uwzględniającej zmienne rs1937, <i>APOE4</i> , wiek, płeć oraz interakcję rs1937 z <i>APOE4</i> ) przeprowadzonej w grupie chorych z LOAD oraz w grupie kontrolnej ..... 72	72
<b>Tabela 29.</b> Modele zaproponowane przez program MDR, składające się z 1-4 zmiennych (status <i>APOE4</i> , rs1937, Gly482Ser, podhaplogrupa U5b), wraz z ich parametrami.....	73
<b>Tabela 30.</b> Modele zaproponowane przez program MDR, składające się z 1-4 zmiennych (status <i>APOE4</i> , rs1937, m.497C>T, podhaplogrupa U5b), wraz z ich parametrami. ....	74

<b>Tabela 31.</b> Wynik wieloczynnikowej regresji logistycznej ryzyka LOAD obejmującej czynniki: status <i>APOE4</i> , polimorfizm rs1937, podhaplogrupę H5, płeć, wiek oraz interakcje <i>APOE4</i> x rs1937, <i>APOE4</i> x H5 oraz rs1937 x podhaplogrupa H5. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 32.</b> Analiza częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs2306604 w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 33.</b> Analiza częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs2306604 w grupie EOAD w porównaniu z grupą kontrolną. ....	<b>76</b>
<b>Tabela 34.</b> Analiza regresji logistycznej uwzględniająca zmienne: status <i>APOE4</i> , wiek, płeć oraz polimorfizm rs2306604 w genie <i>TFAM</i> (1) oraz badanie wzajemnej interakcji rs2306604 i nosicielstwa allelu <i>APOE4</i> (2)....	<b>76</b>
<b>Tabela 35.</b> Częstość genotypów polimorfizmu rs2306604 u osób <i>APOE4+</i> i <i>APOE4-</i> u chorych z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).....	<b>77</b>
<b>Tabela 36.</b> Zestawienie częstości haplotypów tworzonych przez polimorfizmy rs1937 oraz rs2306604 w grupie LOAD oraz w grupie kontrolnej, oraz po stratyfikacji grup ze względu na płeć.....	<b>77</b>
<b>Tabela 37.</b> Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) <i>PGC-1α</i> w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną. ....	<b>78</b>
<b>Tabela 38.</b> Współwystępowanie genotypu polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) z nosicielstwem allelu <i>APOE4</i> w grupie LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K).....	<b>79</b>
<b>Tabela 39.</b> Współwystępowanie genotypu polimorfizmu rs8192678 (c.1444C>T) z nosicielstwem allelu <i>APOE4</i> , rozpatrywane oddzielnie w grupie kobiet i mężczyzn z LOAD w porównaniu z grupą kontrolną (K) ...	<b>79</b>
<b>Tabela 40.</b> Zestawienie częstości genotypów i alleli polimorfizmu c.1444C>T (Gly482Ser) <i>PGC-1α</i> u osób, które rozwinęły LOAD po stadium MCI (n=23) oraz u tych, którzy dotąd pozostają w stadium MCI (n=77) .....	<b>80</b>
<b>Tabela 41.</b> Zestawienie białek SR, których przyłączanie się do sekwencji c.1444C i c.1444T jest odmienne.....	<b>80</b>
<b>Tabela 42.</b> Podsumowanie danych o zidentyfikowanych zmianach w sekwencji <i>PINI</i> .....	<b>85</b>

## 11 PIŚMIENICTWO

1. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, i wsp. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch. Neurol.* 2008;65:1509-17.
2. Alizadeh BZ, Njajou OT, Millán MR, Hofman A, Breteler MM, van Duijn CM. HFE variants, APOE and Alzheimer's disease: findings from the population-based Rotterdam study. *Neurobiol Aging.* 2009;30(2):330-2.
3. Aluise CD, Robinson RA, Beckett TL, Murphy MP, Cai J, Pierce WM, i wsp. Preclinical Alzheimer disease: Brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. *Neurobiol Dis.* 2010;39(2):221-8.
4. Alvarez V, Corao AI, Alonso-Montes C, Sánchez-Ferrero E, De Mena L, Morales B, i wsp. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) gene variation and risk of late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;13(3):275-80.
5. Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* 1906;23:1129–36.
6. Amar S, Shamir A, Ovadia O, Blanaru M, Reshef A, Kremer I, i wsp. Mitochondrial DNA HV lineage increases the susceptibility to schizophrenia among Israeli Arabs. *Schizophr Res.* 2007;94(1-3):354-8.
7. Anandatheerthavarada HK, Devi L. Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease *Neuroscientist* 2007;13:626-38.
8. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, i wsp. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
9. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23(2):147.
10. Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21590-9.
11. Arning L, Haghikia A, Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Pula B, i wsp. Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J Mol Med.* 2010;88(4):431-6.
12. Arnold, S.E., Hyman, B.T., Flory, J., Damasio, A.R., Van Hoesen, G.W. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 1991;1: 103–16.
13. Asada T, Yamagata Z, Kinoshita T, Kinoshita A, Kariya T, Asaka A, Kakuma T. Prevalence of dementia and distribution of ApoE alleles in Japanese centenarians: an almost-complete survey in Yamanashi Prefecture, Japan. *J Am Geriatr Soc.* 1996;44(2):151-5.
14. Azad NA, Al Bugami M, Loy-English I. Gender differences in dementia risk factors. *Gend Med.* 2007;4(2):120-9.
15. Bal J., Mazurczak T. *Zasady dziedziczenia*. W: J. Bal (red.), *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Warszawa, Wyd. PWN SA, wydanie 2, 2008, s.57.
16. Balloux F, Handley LJ, Jombart T, Liu H, Manica A. Climate shaped the worldwide distribution of human mitochondrial DNA sequence variation. *Proc Biol Sci.* 2009;276(1672):3447-55.
17. Baudouin SV, Saunders D, Tiangyou W, Elson JL, Poynter J, Pyle A, i wsp. Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet.* 2005;366(9503):2118-21.

18. Bayer TA, Wirths O. Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2010;2:8.
19. Becker EB, Bonni A. Pin1 in neuronal apoptosis. *Cell Cycle.* 2007;6(11):1332-5.
20. Becker EB, Bonni A. Pin1 mediates neural-specific activation of the mitochondrial apoptotic machinery. *Neuron.* 2006;49(5):655-62.
21. Beckstead WA, Ebbert MT, Rowe MJ, McClellan DA. Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of CytbI7T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS One.* 2009;4(6):e5836.
22. Belin AC, Björk BF, Westerlund M, Galter D, Sydow O, Lind C, i wsp. Association study of two genetic variants in mitochondrial transcription factor A (TFAM) in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2007;420(3):257-62.
23. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* 1998;19(3):173-89.
24. Berlin D, Chong G, Chertkow H, Bergman H, Phillips NA, Schipper HM. Evaluation of HFE (hemochromatosis) mutations as genetic modifiers in sporadic AD and MCI. *Neurobiol Aging.* 2004;25(4):465-74.
25. Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, i wsp. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science.* 2000;290(5500):2302-3.
26. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007;39(1):17-23.
27. Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R1):R4-R11.
28. Bhopal R, Donaldson L. White, European, Western, Caucasian, or what? Inappropriate labeling in research on race, ethnicity, and health. *Am J Public Health.* 1998;88(9):1303-7.
29. Biswas SC, Shi Y, Vonsattel JP, Leung CL, Troy CM, Greene LA. Bim is elevated in Alzheimer's disease neurons and is required for beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2007;27:893–900.
30. Blacker D, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, i wsp. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology* 1997;48(1):139-47.
31. Blansjaar BA, Thomassen R, Van Schaick HW. Prevalence of dementia in centenarians. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2000;15(3):219-25.
32. Blass JP, Gibson GE. Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999;10(5):335-8.
33. Blázquez L, De Juan D, Ruiz-Martínez J, Emparanza JI, Sáenz A, Otaegui D, i wsp. Genes related to iron metabolism and susceptibility to Alzheimer's disease in Basque population. *Neurobiol Aging.* 2007;28(12):1941-3.
34. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003;2(10):605-13.
35. Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 1997;18:S85–S88.
36. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol. Aging* 1995;16: 271–8 [Discussion, 278–84].
37. Brand MD. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol.* 2000;35(6-7):811-20.

38. Burris TP, Krishnan V. Estrogen: a mitochondrial energizer that keeps on going. *Mol Pharmacol*. 2005;68(4):956-8.
39. Butler AW, Ng MY, Hamshere ML, Forabosco P, Wroe R, Al-Chalabi A, Lewis CM, Powell JF. Meta-analysis of linkage studies for Alzheimer's disease--a web resource. *Neurobiol Aging*. 2009;30(7):1037-47.
40. Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 22:223-232.
41. Candore G, Balistreri CR, Lio D, Mantovani V, Colonna-Romano G, Chiappelli M, i wsp. Association between HFE mutations and acute myocardial infarction: a study in patients from Northern and Southern Italy. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;31(1):57-62.
42. Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J Neurochem* 2004;89:1417-26.
43. Carrieri G, Bonafè M, De Luca M, Rose G, Varcasia O, Bruni A, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet*. 2001;108(3):194-8.
44. Castellani RJ, Moreira PI, Liu G, Dobson J, Perry G, Smith MA, Zhu X. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem Res*. 2007;32(10):1640-5.
45. Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet*. 1999;85(1):20-30.
46. Chang DT, Reynolds IJ. Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol* 2006;80:241-68.
47. Chang S, ran Ma T, Miranda RD, Balestra ME, Mahley RW, Huang Y. Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18694-9.
48. Chang SW, Zhang D, Chung HD, Zassenhaus HP. The frequency of point mutations in mitochondrial DNA is elevated in the Alzheimer's brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(1):203-8.
49. Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Andrews RM, Morris CM, Taylor RW, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2000;55(2):302-4.
50. Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM. Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am J Hum Genet*. 2001;68(2):529-32.
51. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, i wsp. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 2009;324:102-5.
52. Combarros O, García-Román M, Fontalba A, Fernández-Luna JL, Llorca J, Infante J, Berciano J. Interaction of the H63D mutation in the hemochromatosis gene with the apolipoprotein E epsilon 4 allele modulates age at onset of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003;15(3):151-4.
53. Connor JR, Lee SY. HFE mutations and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;10(2-3):267-76.
54. Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1992;31(2):327-35.

55. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, i wsp. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3.
56. Correia AP, Pinto JP, Dias V, Mascarenhas C, Almeida S, Porto G. CAT53 and HFE alleles in Alzheimer's disease: a putative protective role of the C282Y HFE mutation. *Neurosci Lett*. 2009;457(3):129-32.
57. Cortina-Borja M, Smith AD, Combarros O, Lehmann DJ. The synergy factor: a statistic to measure interactions in complex diseases. *BMC Res Notes*. 2009;2:105.
58. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10726-31.
59. Coskun PE, Wyrembak J, Derbereva O, Melkonian G, Doran E, Lott IT, Head E, Cotman CW, Wallace DC. Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and down syndrome dementia. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S293-310.
60. Costantini LC, Barr LJ, Vogel JL, Henderson ST. Hypometabolism as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 2008;9 Suppl 2:S16.
61. Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat*. 1998;12(1):1-3.
62. Czarnecka AM, Klemba A, Semczuk A, Plak K, Marzec B, Krawczyk T, i wsp. Common mitochondrial polymorphisms as risk factor for endometrial cancer. *Int Arch Med*. 2009;2(1):33.
63. Dato S, Passarino G, Rose G, Altomare K, Bellizzi D, Mari V, Feraco E, Franceschi C, De Benedictis G. Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(12):1080-2.
64. Davis RE, Miller S, Herrnstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, i wsp. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4526-31.
65. Daw EW, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, Wijsman EM. The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 2000;66(1):196-204.
66. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, i wsp. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*. 1999;13(12):1532-6.
67. de Leon MJ, Ferris SH, George AE, Christman DR, Fowler JS, Gentes C, i wsp. Positron emission tomographic studies of aging and Alzheimer disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 1983;4:568-571.
68. De Meyer G, Shapiro F, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Engelborghs S, De Deyn PP, i wsp. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch Neurol*. 2010;67(8):949-956.
69. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 2008;118(12):4002-13.
70. Debette S, Wolf PA, Beiser A, Au R, Himali JJ, Pikula A, Auerbach S, Decarli C, Seshadri S. Association of parental dementia with cognitive and brain MRI measures in middle-aged adults. *Neurology*. 2009;73(24):2071-8.
71. Deeb SS, Brunzell JD. The Role of the PGC1alpha Gly482Ser Polymorphism in Weight Gain due to Intensive Diabetes Therapy. *PPAR Res*. 2009;2009:649286.
72. Del Bo, R., Bordoni, A., Sciacco, M., Di Fonzo, A., Galbiati, S., Crimi, M., i wsp. Remarkable infidelity of polymerase gammaA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. *Neurology* 2003;61(7):903-908.



73. Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 2006;26:9057-68.
74. Di Lorenzo C, Pierelli F, Coppola G, Grieco GS, Rengo C, Ciccolella M, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroups influence the therapeutic response to riboflavin in migraineurs. *Neurology*. 2009;72(18):1588-94.
75. Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol*. 2010;8(1):e1000294.
76. Domańska-Janik K, Zaleska M. The action of piracetam on <sup>14</sup>C-glucose metabolism in normal and posthypoxic rat cerebral cortex slices. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1977;29(2):111-6.
77. Dwyer BE, Zacharski LR, Balestra DJ, Lerner AJ, Perry G, Zhu X, Smith MA. Getting the iron out: phlebotomy for Alzheimer's disease? *Med Hypotheses*. 2009;72(5):504-9.
78. Edland SD, Silverman JM, Peskind ER, Tsuang D, Wijsman E, Morris JC. Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: evidence for maternal inheritance. *Neurology*. 1996;47(1):254-6.
79. Edland SD, Tobe VO, Rieder MJ, Bowen JD, McCormick W, Teri L, Schellenberg GD, Larson EB, Nickerson DA, Kukull WA. Mitochondrial genetic variants and Alzheimer disease: a case-control study of the T4336C and G5460A variants. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002;16(1):1-7.
80. Egensperger R, Kösel S, Schnopp NM, Mehraein P, Graeber MB. Association of the mitochondrial tRNA(A4336G) mutation with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997;23(4):315-21.
81. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Gaede PH, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, i wsp. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001;44(12):2220-6.
82. Elson JL, Herrnstadt C, Preston G, Thal L, Morris CM, Edwardson JA, i wsp. Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? *Hum Genet*. 2006;119(3):241-54.
83. Erkens T, Bilek K, Van Zeveren A, Peelman LJ. Two new splice variants in porcine PPARGC1A. *BMC Res Notes*. 2008;1:138.
84. Escobar-Khondiker M, Hollerhage M, Muriel MP, Champy P, Bach A, Depienne C, i wsp. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci* 2007;27:7827-7837.
85. Ewbank DC. The APOE gene and differences in life expectancy in Europe. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(1):16-20.
86. Eynon N, Meckel Y, Sagiv M, Yamin C, Amir R, Sagiv M, Goldhammer E, Duarte JA, Oliveira J. Do PPARGC1A and PPARalpha polymorphisms influence sprint or endurance phenotypes? *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20(1):e145-50.
87. Farrer LA, Cuples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, i wsp. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. *JAMA* 1997;278:1349-56.
88. Felty Q, Roy D. Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *J Carcinog*. 2005;4(1):1.
89. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, i wsp. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.

90. Ferrucci L, Giallauria F, Guralnik JM. Epidemiology of aging. *Radiol Clin North Am.* 2008;46(4):643-52.
91. Fesahat F, Houshmand M, Panahi MS, Gharagozli K, Mirzajani F. Do haplogroups H and U act to increase the penetrance of Alzheimer's disease? *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27(3):329-34.
92. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):615-22.
93. Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1475-84.
94. Franks PW, Ekelund U, Brage S, Luan J, Schafer AJ, O'Rahilly S, i wsp. PPARGC1A coding variation may initiate impaired NEFA clearance during glucose challenge. *Diabetologia* 2007;50(3):569-73.
95. Furst AJ, Rabinovici GD, Rostomian AH, Steed T, Alkalay A, Racine C, i wsp. Cognition, glucose metabolism and amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010, wersja elektroniczna dostępna od 22.04.10, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.011
96. Gabryelewicz T. Rozpowszechnienie zespołów otepiennych wśród mieszkańców warszawskiej dzielnicy Mokotów w wieku 65-84 lat. *Psychiatr. Pol.* 1999;3:353-366.
97. Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem* 1994;269:13623-8.
98. García-Lozano JR, Mir P, Alberca R, Aguilera I, Gil Néciga E, Fernández-López O, i wsp. Mitochondrial DNA A4336G mutation in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Eur Neurol.* 2002;48(1):34-6.
99. Gawęda-Walerych K, Maruszak A, Safranow K, Bialecka M, Klodowska-Duda G, Czyzewski K, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J Neural Transm.* 2008;115(11):1521-6.
100. Gilkerson RW. Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):1899-906.
101. Gillardon F, Rist W, Kussmaul L, Vogel J, Berg M, Danzer K, i wsp. Proteomic and functional alterations in brain mitochondria from Tg2576 mice occur before amyloid plaque deposition. *Proteomics.* 2007;7(4):605-16.
102. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet.* 2010;19(17):3343-53.
103. Gorlov I, Gorlova O, Frazier M, Spitz M, Amos C. Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. *Clin Genet.* 2010, wersja elektroniczna dostępna od 25.08.10, doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01535.x.
104. Gotz J, Schonrock N, Vissel B, Ittner LM. Alzheimer's disease selective vulnerability and modeling in transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 2009;18:243-251.
105. Günther C, von Hadeln K, Müller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, i wsp. Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* 2004;369(3):219-23.
106. Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E, Tabaton M. Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci.* 2010;2:3.

107. Hall EC 2nd, Lee SY, Mairuae N, Simmons Z, Connor JR. Expression of the HFE allelic variant H63D in SH-SY5Y cells affects tau phosphorylation at serine residues. *Neurobiol Aging*. 2009, wersja elektroniczna sostępna od 21.09.09, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.012
108. Hall EC 2nd, Lee SY, Simmons Z, Neely EB, Nandar W, Connor JR. Prolyl-peptidyl isomerase, Pin1, phosphorylation is compromised in association with the expression of the HFE polymorphic allele, H63D. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(4):389-95.
109. Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, i wsp. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13145-50.
110. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
111. Helgason A, Sigureth Ardóttir S, Gulcher JR, Ward R, Stefánsson K. mtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *Am J Hum Genet*. 2000;66(3):999-1016.
112. Helisalmi S, Vepsäläinen S, Hiltunen M, Koivisto AM, Salminen A, Laakso M, Soininen H. Genetic study between SIRT1, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  genes and Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2008;255(5):668-73.
113. Henderson JN, Crook R, Crook J, Hardy J, Onstead L, Carson-Henderson L, i wsp. Apolipoprotein E4 and tau allele frequencies among Choctaw Indians. *Neurosci Lett*. 2002;324(1):77-9.
114. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, Sezgin E, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS*. 2008;22(18):2429-39.
115. Higgs P.G., Attwood T.K. Kwasy nukleinowe, białka i aminokwasy. W: D Kamińska-Hass (red. wydania polskiego), *Bioinformatyka i ewolucja molekularna*. Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 38.
116. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008;372(9634):216-23.
117. Honea RA, Swerdlow RH, Vidoni ED, Goodwin J, Burns JM. Reduced gray matter volume in normal adults with a maternal family history of Alzheimer disease. *Neurology*. 2010;74(2):113-20.
118. Hong WK, Han EH, Kim DG, Ahn JY, Park JS, Han BG. Amyloid-beta-peptide reduces the expression level of mitochondrial cytochrome oxidase subunits. *Neurochem Res*. 2007;32(9):1483-8.
119. Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(15):6892-5.
120. Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement*. 2010;6(5):420-4.
121. Irwin JA, Saunier JL, Niederstätter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, i wsp. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol*. 2009;68(5):516-27.
122. Ivanova R, Lepage V, Charron D, Schächter F. Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology*. 1998;44(6):349.
123. Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12382-7.
124. Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, i wsp. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet*. 2008;40(5):592-9.

125. Johnson KA. Amyloid imaging of Alzheimer's disease using Pittsburgh Compound B. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;6:496-503.
126. Johnstone D, Milward EA. Molecular genetic approaches to understanding the roles and regulation of iron in brain health and disease. *J Neurochem*. 2010;113(6):1387-402.
127. Jones RW. Dimebon disappointment. *Alzheimers Res Ther*. 2010;2(5):25.
128. Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, i wsp. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol*. 2008;7(9):812-26.
129. Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*. 2007;7(1-2):39-44.
130. Kauwe JS, Bertelsen S, Mayo K, Cruchaga C, Abraham R, Hollingworth P, i wsp. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suggestive synergy between genetic variants in TF and HFE as risk factors for Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153B(4):955-9.
131. Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, i wsp. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:50310-20.
132. Khan SM, Cassarino DS, Abramova NN, Keeney PM, Borland MK, Trimmer PA, i wsp. Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways. *Ann Neurol* 2000;48:148-55.
133. Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2008;41:932-6.
134. Khusnutdinova E, Gilyazova I, Ruiz-Pesini E, Derbeneva O, Khusainova R, Khidiyatova I, i wsp. A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:1-20.
135. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500-503.
136. Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, i wsp. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. 2006;172(1):373-87.
137. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, i wsp. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001;56(9):1143-53.
138. Kok E, Haikonen S, Luoto T, Huhtala H, Goebeler S, Haapasalo H, Karhunen PJ. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol*. 2009;65(6):650-7.
139. Kontush A. Amyloid-beta: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1120-31.
140. Korpelainen H. Genetic maternal effects on human life span through the inheritance of mitochondrial DNA. *Hum Hered*. 1999;49(4):183-5.
141. Krüger J, Hinttala R, Majamaa K, Remes AM. Mitochondrial DNA haplogroups in early-onset Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Mol Neurodegener*. 2010;5:8.
142. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, i wsp. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005;309:481-4.

143. Lakatos A, Derbeneva O, Younes D, Keator D, Bakken T, Lvova M, i wsp. Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging*. 2010;31(8):1355-63.
144. Lambert JC, Amouyel P. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21:1-7.
145. Lambert JC, Benisevain F, Chapuis J, Cottel D, Amouyel P. Association study of the PIN1 gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2006;402(3):259-61.
146. Laumet G, Chouraki V, Grenier-Boley B, Legry V, Heath S, Zelenika D, i wsp. Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1181-8.
147. Lee SY, Patton SM, Henderson RJ, Connor JR. Consequences of expressing mutants of the hemochromatosis gene (HFE) into a human neuronal cell line lacking endogenous HFE. *FASEB J*. 2007;21(2):564-76.
148. Lehmann DJ, Schuur M, Warden DR, Hammond N, Belbin O, Kölsch H, i wsp. Transferrin and HFE genes interact in Alzheimer's disease risk: the Epistasis Project. *Neurobiol Aging*. 2010, wersja elektroniczna dostępna od 1.09.10, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.018
149. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, i wsp. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*. 2005;3(4):e101.
150. Leuner K, Kurz C, Guidetti G, Orgogozo JM, Müller WE. Improved mitochondrial function in brain aging and Alzheimer disease - the new mechanism of action of the old metabolic enhancer piracetam. *Front Neurosci*. 2010;4. pii: 44.
151. Levin BC, Holland KA, Hancock DK, Coble M, Parsons TJ, Kienker LJ, i wsp. Comparison of the complete mtDNA genome sequences of human cell lines--HL-60 and GM10742A--from individuals with promyelocytic leukemia and leber hereditary optic neuropathy, respectively, and the inclusion of HL-60 in the NIST human mitochondrial DNA standard reference material--SRM 2392-I. *Mitochondrion*. 2003;2(6):387-400.
152. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004;119:873-87.
153. Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstråle M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, i wsp. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1518-26.
154. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
155. Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol* 2002; 12:164-172.
156. Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase PIN1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999; 399:784-788.
157. Lucci B. The contribution of Gaetano Perusini to the definition of Alzheimer's disease. *Ital J Neurol Sci*. 1998;19(1):49-52.
158. Lucia A, Gómez-Gallego F, Barroso I, Rabadán M, Bandrés F, San Juan AF, i wsp. PPARGC1A genotype (Gly482Ser) predicts exceptional endurance capacity in European men. *J Appl Physiol*. 2005;99(1):344-8.

159. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5644-51.
160. Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko MV, Czarny J, Woźniak M, Miścicka-Sliwka D. Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians. *Ann Hum Genet.* 2002;66(Pt 4):261-83.
161. Mancuso M, Coppedè F, Murri L, Siciliano G. Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1631-46.
162. Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, Terreros JL, Aragonés T, Casajús JA, i wsp.. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion.* 2009;9(1):27-30.
163. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, i wsp. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer--is it a paradox? *Mitochondrion.* 2010;10(2):102-7.
164. Maruszak A, Canter JA, Styczyńska M, Zekanowski C, Barcikowska M. Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease--is there a connection? *Neurobiol Aging.* 2009a;30(11):1749-55.
165. Maruszak A, Safranow K, Gustaw K, Kijanowska-Haładyna B, Jakubowska K, Olszewska M, i wsp. PIN1 gene variants in Alzheimer's disease. *BMC Med Genet.* 2009b;10:115.
166. Mayeux R. Apolipoprotein E, Alzheimer disease, and African Americans. *Arch Neurol.* 2003;60(2):161-3.
167. McKhan G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease:report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
168. Metspalu M, Kivisild T, Metspalu E, Parik J, Hudjashov G, Kaldma K, i wsp. Most of the extant mtDNA boundaries in south and southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans. *BMC Genet.* 2004;5:26.
169. Meyer JM, Breitner JC. Multiple threshold model for the onset of Alzheimer's disease in the NAS-NRC twin panel. *Am J Med Genet* 1998;81(1):92-97.
170. 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.
171. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, i wsp. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):171-6.
172. Mitchell RM, Lee SY, Simmons Z, Connor JR. HFE polymorphisms affect cellular glutamate regulation. *Neurobiol Aging.* 2009, wersja elektroniczna dostępna od 25.06.09, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.016
173. Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and  $\beta$ -amyloid peptides. *Nat Genet* 1996;14:55-61.
174. Moalem S, Percy ME, Andrews DF, Kruck TP, Wong S, Dalton AJ, i wsp. Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer disease? *Am J Med Genet.* 2000;93(1):58-66.
175. Montiel-Sosa F, Ruiz-Pesini E, Enríquez JA, Marcuello A, Díez-Sánchez C, Montoya J, i wsp. Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages. *Gene.* 2006;368:21-7.
176. Moreira PI, Zhu X, Liu Q, Honda K, Siedlak SL, Harris PL, i wsp. Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease. *Biol Res* 2006;39:7-13.
177. Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, De Santi S, de Leon MJ. Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(3):843-54.
178. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Brys M, Glodzik L, Rich K, i wsp. Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease. *Neurology* 2009;72:513-20.

179. Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1147:180-95.
180. Mosconi L, Sorbi S, de Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS, Tsui W, i wsp. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 2006, 47:1778-1786.
181. Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, i wsp. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*. 2000;290(5500):2304-5.
182. Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, Michikawa M. Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells. *Mol Neurodegener*. 2009;4:35.
183. Nalla VK, Rogan PK. Automated splicing mutation analysis by information theory. *Hum Mutat*. 2005;25(4):334-42.
184. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(1):1-14.
185. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet*. 2003;112(1):29-33.
186. Nowotny P, Bertelsen S, Hinrichs AL, Kauwe JS, Mayo K, Jacquart S, i wsp. Association studies between common variants in prolyl isomerase Pin1 and the risk for late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2007;419(1):15-7.
187. Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(7):631-41.
188. Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, Motohashi N, Nakamura M, Hayashi T, i wsp. Intraneuronal amyloid beta accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2010;37:731-7.
189. Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990;40:1302-3.
190. Parson W, Bandelt HJ. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(1):13-9.
191. Pastorino L, Sun A, Lu PJ, Zhou XZ, Balastik M, Finn G, i wsp. The prolyl isomerase PIN1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* 2006; 440:528-534.
192. Perls T. Dementia-free centenarians. *Exp Gerontol*. 2004;39(11-12):1587-93.
193. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999;56:303-308.
194. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med*. 1993;106(2):85-90.
195. Plassman BL, Breitner JC. Recent advances in the genetics of Alzheimer's disease and vascular dementia with an emphasis on gene-environment interactions. *J Am Geriatr Soc*. 1996;44(10):1242-50.
196. Poli M, Gatta LB, Dominici R, Lovati C, Mariani C, Albertini A, Finazzi D. DNA sequence variations in the prolyl isomerase Pin1 gene and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2005;389(2):66-70.
197. Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet*. 2001;69(1):124-37.

198. Pulliam JF, Jennings CD, Kryscio RJ, Davis DG, Wilson D, Montine TJ, i wsp. Association of HFE mutations with neurodegeneration and oxidative stress in Alzheimer's disease and correlation with APOE. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003;119B(1):48-53.
199. Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, Lambert C, Keers SM, Allcock LM, i wsp. Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol.* 2005;57(4):564-7.
200. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol.* 2009;66(3):352-61.
201. Reddy PH, Beal MF. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49(3):618-32.
202. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, i wsp. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:284-9.
203. Riddell DR, Zhou H, Atchison K, Warwick HK, Atkinson PJ, Jefferson J, i wsp. Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J Neurosci* 2008;28:11445-53.
204. Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, i wsp. Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(4):246-54.
205. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):138-47.
206. Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jäger S, Handschin C, Spiegelman BM. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):7933-8.
207. Roostalu U, Kutuev I, Loogväli EL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, i wsp. Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol Biol Evol.* 2007;24(2):436-48.
208. Rosa A, Fonseca BV, Krug T, Manso H, Gouveia L, Albergaria I, i wsp. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Med Genet.* 2008;9:57.
209. Rosario ER, Carroll JC, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ. Androgens regulate the development of neuropathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2006;26(51):13384-9.
210. Rossa G. Rozpowszechnienie otyłości typu Alzheimera i otyłości naczyniowego na terenie miasta i gminy Świebodzin. *Psychiatr. Pol.* 1997;31:121-134.
211. Rottkamp CA, Raina AK, Zhu X, Gaier E, Bush AI, Atwood CS, i wsp. Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(4):447-50.
212. Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Chérif C, i wsp. Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet.* 2003;35(1):65-9.
213. Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and successful. *Science.* 1987;237(4811):143-9.
214. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, i wsp.. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000;67(3):682-96.
215. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 2004;303(5655):223-6.



216. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. Wyd. 3. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.
217. Sampietro M, Caputo L, Casatta A, Meregalli M, Pellagatti A, Tagliabue J, i wsp. The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001;22(4):563-8.
218. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F, i wsp. Evidence for sub-haplogroup H5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010;5(8). pii: e12037.
219. Santos C, Sierra B, Alvarez L, Ramos A, Fernández E, Nogués R, Aluja MP. Frequency and pattern of heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 2008;67(2):191-200.
220. Segat L, Pontillo A, Annoni G, Trabattoni D, Vergani C, Clerici M, i wsp. PIN1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007;28:69-74.
221. Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC i wsp. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010;303(18):1832-40.
222. Seshadri S, Wolf PA. Lifetime risk of stroke and dementia: current concepts, and estimates from the Framingham Study. *Lancet Neurol*. 2007;6(12):1106-14.
223. Shastry BS. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. *Methods Mol Biol* 2009;578:3-22.
224. Shlush LI, Atzmon G, Weissshof R, Behar D, Yudkovsky G, Barzilai N, Skorecki K. Ashkenazi Jewish centenarians do not demonstrate enrichment in mitochondrial haplogroup J. *PLoS One*. 2008;3(10):e3425.
225. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, i wsp. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics*. 1993;17(1):171-84.
226. Slegers K, Lambert JC, Bertram L, Cruts M, Amouyel P, Van Broeckhoven C. The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Genet*. 2010;26(2):84-93.
227. Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9866-9868.
228. Smith MA, Zhu X, Tabaton M, Liu G, McKeel DW Jr, Cohen ML, i wsp. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(1):363-72.
229. Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H, i wsp. Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians. *Neurology*. 1995;45(5):903-7.
230. Sörensen L, Ekstrand M, Silva JP, Lindqvist E, Xu B, Rustin P, Olson L, Larsson NG. Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci*. 2001;21(20):8082-90.
231. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, i wsp. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127(2):397-408.
232. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(5):1977-81.
233. Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, Wallace DC, Shadel GS, Mishmar D. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet*. 2009;5(5):e1000474.

234. Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, i wsp. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging* 2006; 27:1564-1576.
235. Sultana R, Butterfield DA. Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):341-53.
236. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2:S265-79.
237. Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2004;63(1):8-20.
238. Swerdlow RH, Parks JK, Cassarino DS, Maguire DJ, Maguire RS, Bennett JP Jr, i wsp. Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology* 1997;49:918-25.
239. Takasaki S. Mitochondrial haplogroups associated with Japanese centenarians, Alzheimer's patients, Parkinson's patients, type 2 diabetic patients and healthy non-obese young males. *J Genet Genomics.* 2009;36(7):425-34.
240. Tanaka D, Nakada K, Takao K, Ogasawara E, Kasahara A, Sato A, i wsp. Normal mitochondrial respiratory function is essential for spatial remote memory in mice. *Mol Brain* 2008;1:21.
241. Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, i wsp. The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA.* 1998;279(10):751-5.
242. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, i wsp. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science.* 1987;235(4791):880-4.
243. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991;30(4):572-80.
244. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, i wsp. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann. Neurol.* 2008;63:377-387.
245. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, i wsp. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* 1996;144(4):1835-50.
246. Tranah GJ. Mitochondrial-nuclear epistasis: Implications for human aging and longevity. *Ageing Res Rev.* 2010, wersja elektroniczna dostępna od 25.06.10, doi:10.1016/j.arr.2010.06.003.
247. Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, i wsp. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17993-8.
248. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, i wsp. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004;429:417-23.
249. Trimmer PA, Keeney PM, Borland MK, Simon FA, Almeida J, Swerdlow RH, i wsp. Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture. *Neurobiol Dis.* 2004;15(1):29-39.
250. Tysoe C, Robinson D, Brayne C, Dening T, Paykel ES, Huppert FA, Rubinsztein DC. The tRNA(Gln) 4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years. *J Med Genet.* 1996;33(12):1002-6.

251. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, i wsp. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett*. 2004;365(1):28-32.
252. Van Gassen G, Annaert W. Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease. *Neuroscientist* 2003;9(2):117-126.
253. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2009;30(2):E386-94.
254. Vimalaswaran KS, Luan J, Andersen G, Muller YL, Wheeler E, Brito EC, i wsp. The Gly482Ser genotype at the PPARGC1A gene and elevated blood pressure: a meta-analysis involving 13,949 individuals. *J Appl Physiol*. 2008;105(4):1352-8.
255. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE, Pallardo FV. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(14):1369-74.
256. Viña J, Lloret A. Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 2010;20 Suppl 2:S527-33.
257. von Gunten A, Ebbing K, Imhof A, Giannakopoulos P, Kövari E. Brain aging in the oldest-old. *Curr Gerontol Geriatr Res*. 2010. pii: 358531.
258. Wallace DC, Fan W. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev*. 2009;23(15):1714-36.
259. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003;68:479-86.
260. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005;39:359-407.
261. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, i wsp. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008;320(5875):539-43.
262. Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2008a;3(7):e2698.
263. Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol* 2008b;173:470-82.
264. Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, Safiulina D, Liiv J, Kuum M, Kaasik A. PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem*. 2009;284(32):21379-85.
265. Webster MT, Pearce BR, Bowen DM, Francis PT. The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells. *J Neural Transm* 1998;105:839-53.
266. Wender M, Mularczyk J, Modestowicz R. Epidemiologia choroby Alzheimer'a w wybranym regionie Polski. *Przegl. Epidemiol*. 1990;3:215-221.
267. Weng SW, Lin TK, Wang PW, Chen IY, Lee HC, Chen SD, i wsp. Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha gene is associated with oxidative stress and abdominal obesity. *Metabolism*. 2010;59(4):581-6.
268. Westmark PR, Westmark CJ, Wang S, Levenson J, O'Riordan KJ, Burger C, Malter JS. Pin1 and PKMzeta sequentially control dendritic protein synthesis. *Sci Signal*. 2010;3(112):ra18.

269. Wilson MR, Allard MW, Monson K, Miller KW, Budowle B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Sci Int.* 2002;129(1):35-42.
270. Wragg MA, Talbot CJ, Morris JC, Lendon CL, Goate AM. No association found between Alzheimer's disease and a mitochondrial tRNA glutamine gene variant. *Neurosci Lett.* 1995;201(2):107-10.
271. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, i wsp. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999;98(1):115-24.
272. Xu S, Zhong M, Zhang L, Wang Y, Zhou Z, Hao Y, i wsp. Overexpression of Tfam protects mitochondria against beta-amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *FEBS J.* 2009;276(14):3800-9.
273. Yaffe K, Barnes D, Lindquist K, Cauley J, Simonsick EM, Penninx B, i wsp. Endogenous sex hormone levels and risk of cognitive decline in an older biracial cohort. *Neurobiol Aging.* 2007;28(2):171-8.
274. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):514-9.
275. Yu X, Gimsa U, Wester-Rosenlöf L, Kanitz E, Otten W, Kunz M, Ibrahim SM. Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res.* 2009;19(1):159-65.
276. Zhang J, Moseley A, Jegga AG, Gupta A, Witte DP, Sartor M i wsp. Neural system-enriched gene expression: relationship to biological pathways and neurological diseases. *Physiol Genomics.* 2004;18(2):167-83.
277. Zhao H, Shen J, Medico L, Platek M, Ambrosone CB. Length heteroplasmies in human mitochondrial DNA control regions and breast cancer risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1(3):184-192.
278. Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP. Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(9-10):788-806.
279. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2202-10.