



Wydział Lekarski
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Magdalena Krygier

**Określenie związku pomiędzy stopniem metylacji genu *HTT*
a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi
choroby Huntingtona**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik i promotor: prof. dr hab. n. med. Janusz Limon
Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Stanisławska - Sachadyn

Praca sfinansowana z grantu naukowego Narodowego Centrum Nauki
nr UMO-2011/03/B/NZ2/01422

GDAŃSK 2017

Pragnę złożyć podziękowania Promotorowi rozprawy Profesorowi Januszowi Limonowi oraz Promotorowi Pomocniczemu Doktor Annie Stanisławskiej - Sachadyn za opiekę naukową, zaangażowanie i nieocenione wsparcie merytoryczne. Dziękuję całemu Zespołowi Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za okazaną pomoc i stworzenie życzliwej atmosfery pracy.

Dziękuję również Neurologom i Neuropsychologom, pracującym w polskich ośrodkach Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona za dostarczenie danych pacjentów oraz materiału biologicznego, a także Pacjentom i ich Rodzinom za udział w badaniu.

Serdecznie dziękuję moim Bliskim i Przyjaciółom za okazaną cierpliwość i wsparcie na każdym kroku.

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	5
1.1. Abstract.....	8
2. WYKAZ SKRÓTÓW	11
3. WSTĘP	15
3.1. Choroba Huntingtona (HD).....	15
3.1.1. Epidemiologia.....	15
3.1.2. Podłoże molekularne.....	16
3.1.3. Toksyczność zmutowanej huntingtyny.....	17
3.1.4. Obraz neuropatologiczny.....	18
3.1.5. Przebieg kliniczny choroby.....	19
3.1.5.1. Zaburzenia ruchowe.....	20
3.1.5.2. Zaburzenia funkcji poznawczych.....	21
3.1.5.3. Objawy psychiatryczne i behawioralne.....	22
3.1.6. Skale oceny klinicznej zaawansowania choroby.....	24
3.1.7. Czynniki modyfikujące wiek pojawienia się objawów HD.....	26
3.1.8. Leczenie objawowe.....	28
3.2. Epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów.....	29
3.2.1. Metylacja DNA.....	29
3.2.2. Modyfikacje potranslacyjne histonów.....	32
3.2.3. Związek pomiędzy metylacją DNA a modyfikacjami potranslacyjnymi histonów.....	33
3.2.4. Niekodujący RNA.....	34
3.3. Zaburzenia metylacji DNA w chorobach związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych.....	34
3.3.1. Zespół łamliwego chromosomu X (FraX).....	35
3.3.2. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 2.....	36
3.3.3. Ataksja Friedreicha.....	36

3.4. Znaczenie wybranych modyfikacji epigenetycznych w patogenezie choroby Huntingtona.....	37
3.4.1. Zaburzenia modyfikacji potranslacyjnych histonów.....	37
3.4.2. Metylacja DNA w chorobie Huntingtona.....	39
3.5. Metody badania metylacji DNA.....	40
3.5.1. Ocena całkowitego poziomu metylacji DNA.....	42
3.5.2. Analiza stopnia metylacji dinukleotydów CpG pojedynczego genu.....	42
3.5.2.1. Metody wykorzystujące trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	42
3.5.2.2. Chemiczna modyfikacja cytozyny przez wodorosiarczyn sodu.....	43
3.5.3. Analiza metylacji DNA w skali genomowej.....	44
4. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	46
5. MATERIAŁY I METODY	47
5.1. Analiza wpływu wybranych czynników klinicznych i molekularnych na wiek zachorowania (AOO, ang. <i>age of onset</i>)	47
5.1.1. Materiał.....	47
5.1.1.1. Przeprowadzone analizy oraz charakterystyka badanych grup.....	48
5.1.2. Metody statystyczne.....	50
5.2. Badanie metylacji genu <i>HTT</i> metodą trawienia DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (MSRE-qPCR)	51
5.2.1. Materiał.....	51
5.2.1.1. Kryteria włączenia i wyłączenia do badania.....	52
5.2.1.2. Charakterystyka grupy badanej.....	53
5.2.1.3. Charakterystyka grupy kontrolnej.....	54
5.2.2. Metody.....	55
5.2.2.1. Izolacja genomowego DNA.....	55
5.2.2.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi.....	55
5.2.2.3. Projektowanie starterów do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy.....	57
5.2.2.4. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy.....	58

5.2.2.5.	Interpretacja wyników reakcji qPCR.....	59
5.2.2.6.	Analiza statystyczna danych.....	62
5.3.	Badanie metylacji genu <i>HTT</i> metodą mikromacierzy metylacyjnych.....	63
5.3.1.	Materiał.....	63
5.3.2.	Metody.....	64
5.3.2.1.	Oznaczenie stopnia metylacji genu <i>HTT</i>	64
5.3.2.2.	Analiza statystyczna danych mikromacierzowych.....	66
6.	WYNIKI.....	68
6.1.	Wpływ wybranych czynników klinicznych i molekularnych na wiek zachorowania (AOO, ang. <i>age of onset</i>).....	68
6.1.1.	Analizy kliniczne, przeprowadzone w całej grupie chorych.....	68
6.1.1.1.	Zależność wieku zachorowania od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i>	68
6.1.1.2.	Wpływ płci chorego rodzica na wiek zachorowania pacjenta.....	70
6.1.1.3.	Zależność wieku zachorowania pacjenta od obecności choroby u rodzica, bez względu na jego płeć.....	71
6.1.1.4.	Zależność wieku zachorowania pacjenta od wieku zachorowania rodzica.....	72
6.1.2.	Wyniki analiz klinicznych, przeprowadzonych w grupie chorych z $(CAG)_n \leq 50$	73
6.1.3.	Podsumowanie analiz klinicznych, których celem było określenie wpływu wybranych czynników na wiek zachorowania (AOO, ang. <i>age of onset</i>).....	75
6.2.	Wyniki badania metylacji genu <i>HTT</i>, przeprowadzonego metodą MSRE-qPCR.....	76
6.2.1.	Modyfikacja protokołu badania MSRE-qPCR.....	76
6.2.2.	Wyniki badania MSRE-qPCR.....	80
6.2.2.1.	Charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej pod względem stopnia metylacji DNA w genie <i>HTT</i>	80
6.2.2.2.	Związek pomiędzy poziomem metylacji DNA a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby Huntingtona.....	82

6.2.2.2.1.	Ocena zależności poziomu metylacji DNA od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby oraz liczby CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i>	83
6.2.2.2.2.	Wpływ stopnia metylacji DNA na wiek zachorowania (AOO, ang. <i>age of onset</i>).....	83
6.2.2.2.3.	Ocena związku pomiędzy punktacją w skalach zaawansowania choroby a stopniem metylacji DNA w genie <i>HTT</i>	84
6.2.3.	Podsumowanie wyników badania metylacji genu <i>HTT</i> , przeprowadzonego metodą MSRE-qPCR.....	85
6.3.	Wyniki badania metylacji genu <i>HTT</i>, przeprowadzonego metodą mikromacierzy metylacyjnych.....	86
6.3.1.	Związek pomiędzy poziomem metylacji genu <i>HTT</i> a wybranymi parametrami klinicznymi i molekularnymi choroby Huntingtona.....	87
6.3.1.1.	Określenie zależności poziomu metylacji wybranych CpG od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby oraz liczby CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i>	87
6.3.1.2.	Określenie zależności wieku zachorowania od liczby powtórzeń CAG i poziomu metylacji DNA w wybranych CpG.....	88
6.3.2.	Podsumowanie wyników badań mikromacierzowych.....	89
7.	DYSKUSJA.....	92
7.1.	Analiza wpływu wybranych czynników na wiek zachorowania (AOO, ang. <i>age of onset</i>).....	93
7.2.	Ocena metylacji genu <i>HTT</i> w chorobie Huntingtona.....	99
7.3.	Określenie związku pomiędzy wynikami analizy metylacji genu <i>HTT</i> a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby.....	103
8.	WNIOSKI.....	109
9.	PIŚMIENNICTWO.....	111
10.	ZAŁĄCZNIK.....	125
11.	SPIS TABEL.....	133
12.	SPIS RYCIN.....	135

1. STRESZCZENIE

Choroba Huntingtona (HD, ang. *Huntington's disease*) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną, spowodowaną zwielokrotnieniem sekwencji trójki nukleotydowej CAG w genie *HTT*. Mimo, że liczba powtórzeń CAG silnie koreluje z czasem wystąpienia objawów choroby, obserwuje się istotne różnice pomiędzy wiekiem zachorowania (AOO, ang. *age of onset*) u osób z tą samą liczbą powtórzeń, nawet w obrębie jednej rodziny. Sugeruje to udział innych czynników modyfikujących w przebiegu tego schorzenia.

Patomechanizm śmierci neuronów w HD nie został dotychczas ostatecznie poznany. Z danych literaturowych wynika, że w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych istotne znaczenie odgrywają zmiany epigenetyczne, zwłaszcza metylacja DNA oraz histonów. Jak dotąd nie opublikowano wyników badań wskazujących, czy stopień metylacji genu *HTT* jest czynnikiem modyfikującym przebieg kliniczny HD.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie, czy u pacjentów z chorobą Huntingtona dochodzi do nieprawidłowej metylacji genu *HTT* w DNA, pochodzącym z komórek krwi obwodowej, a także określenie związku pomiędzy stopniem metylacji tego genu a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. W ramach poszukiwań wpływu metylacji DNA na przebieg HD przeprowadzono również analizy kliniczne, polegające na ocenie udziału wybranych czynników w zmienności AOO, w grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona. Czynniki te obejmowały: liczbę powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n), rodzicielskie pochodzenie zmutowanego allela, występowanie choroby u rodzica oraz wiek zachorowania rodzica.

Materiał do analiz klinicznych stanowiły dane, dotyczące 452 objawowych pacjentów z chorobą Huntingtona, u których określono wiek zachorowania oraz (CAG)_n. Dane te otrzymano z pięciu ośrodków w Polsce, należących do Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona (EHDN, ang. *European Huntington's Disease Network*). W analizie statystycznej zastosowano jedno- i wieloczynnikowe modele regresji liniowej.

Badanie profilu metylacji genu *HTT* przeprowadzono w DNA, wyizolowanym z krwi obwodowej, za pomocą dwóch technik molekularnych. Metodą trawienia DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (MSRE-qPCR, ang. *methylation-sensitive restriction enzyme – quantitative polymerase chain reaction*) zbadano stopień metylacji czterech wybranych dinukleotydów CpG w grupie 151 pacjentów z HD oraz 117 zdrowych ochotników. Dodatkowo, u 32 pacjentów oraz u 16 osób zdrowych określono stopień metylacji 58 dinukleotydów CpG w obrębie genu *HTT*, za pomocą mikromacierzy Infinium HumanMethylation450 BeadChip firmy Illumina.

W badanej grupie 452 pacjentów z chorobą Huntingtona zmienna $(CAG)_n$ wyjaśniała 75,1% zmienności w wieku zachorowania, natomiast w grupie chorych z $(CAG)_n \leq 50$ – 54,3%. Nie wykazano, aby płeć rodzica od którego pacjent dziedziczy zmutowany allel, obok $(CAG)_n$, istotnie wpływała na wiek zachorowania pacjenta. W obu grupach wykazano statystycznie istotną zależność wieku zachorowania od obecności choroby u rodzica, bez względu na jego płeć, jak również od wieku zachorowania rodzica.

Podczas przeprowadzania badań molekularnych metodą MSRE-qPCR wykazano, że w reakcji qPCR stosowanie DNA nietrawionego (jako referencyjnego) wiąże się z uzyskiwaniem zawyżonych wyników poziomu metylacji DNA, co mogło wynikać z różnic we fragmentacji DNA próbek badanych i próbek kontrolnych. Na tej podstawie zmodyfikowano protokół badawczy i jako DNA referencyjny zastosowano DNA trawiony enzymem restrykcyjnym, którego miejsce trawienia nie znajdowało się w obrębie żadnego z badanych amplikonów. Opracowana modyfikacja umożliwia bardziej precyzyjny pomiar ilościowy produktów w reakcji qPCR, przez uzyskanie zbliżonego stopnia fragmentacji próbek DNA badanego i referencyjnego.

Badanie profilu metylacji genu *HTT* nie wykazało istotnych różnic pomiędzy średnim poziomem metylacji tego genu w grupie pacjentów z HD i w grupie osób zdrowych. Nie wykazano istotnej korelacji między stopniem metylacji badanych dinukleotydów CpG a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby Huntingtona, które obejmowały: wiek pacjenta, jego płeć, czas trwania choroby, liczbę powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* oraz punktację w skalach zaawansowania

zaburzeń ruchowych i zaburzeń funkcjonowania. Stwierdzono istotną zależność wieku zachorowania od poziomu metylacji jedynie w obrębie dinukleotydu nr cg05874888 w mikromacierzy Infinium (Illumina), zlokalizowanego na brzegu wyspy CpG, w promotorze genu *HTT* (ang. *CpG shore*). Z uwagi na małą liczbę analizowanych chorych, potwierdzenie istnienia takiej zależności wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej nie wskazują na występowanie zaburzeń metylacji genu *HTT* w DNA, pochodzącym z krwi obwodowej pacjentów z chorobą Huntingtona. W pracy nie wykazano również, aby imprinting genomowy miał wpływ na przebieg tej choroby. Zgodnie z literaturą, w badanej grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona liczba powtórzeń CAG wyjaśnia znaczną część zmienności w wieku zachorowania. Nie można wykluczyć, że za część rezydualnej zmienności w AOO odpowiadają modyfikacje epigenetyczne, takie jak poziom metylacji DNA w obrębie brzegu wyspy CpG w promotorze *HTT*, jednak potwierdzenie ich udziału wymaga dalszych badań. W celu identyfikacji ewentualnych, tkankowo-specyficznych zaburzeń metylacji genu *HTT* oraz ich związku z przebiegiem klinicznym choroby Huntingtona wskazane jest określenie profilu metylacji tego genu w tkankach, które ulegają w największym stopniu degeneracji w HD, takich jak tkanka nerwowa.

1.1. ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative disorder, caused by an abnormal expansion of the trinucleotide CAG tandem repeat in the *HTT* gene. Although age of onset (AOO) of the disease is strongly associated with the length of CAG expansion ((CAG)_n), a considerable variation in the AOO has been observed between individuals carrying the same (CAG)_n numbers. This observation suggests that there are other factors modifying the phenotype of the disease that remain still unexplained.

The mechanism of neuronal dysfunction in Huntington's disease is still poorly understood. Epigenetic modifications such as DNA and histone methylation have been found to play an important role in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, associated with expanded trinucleotide repeats. However, it seems that the association of *HTT* gene methylation with age of onset and clinical progression in Huntington's disease has never been investigated.

The aim of the study was to analyse the pattern of DNA methylation within the *HTT* gene and its association with selected molecular and clinical features of Huntington's disease. Additionally, to identify possible epigenetic mechanisms, that modify the phenotype of the disease, the impact of several factors on the variability of AOO has been determined. These factors included: CAG repeat length in the mutated allele, sex of the affected parent, presence of HD in a parent, and parental age of onset.

Clinical data were obtained from 452 patients with Huntington's disease, in whom the age of onset and CAG repeat length in the mutated allele were determined. Data were collected from five Polish centres, belonging to European Huntington's Disease Network (EHDN). The impact of selected clinical factors on the variability of AOO was analysed using simple and multiple linear regression models.

The examination of *HTT* methylation pattern was conducted with two molecular methods. Using methylation sensitive restrictive enzyme digestion, followed by quantitative polymerase chain reaction (MSRE-qPCR) DNA methylation level was determined within four selected CpG dinucleotides (CpGs), in the group of 151 HD patients and 117 controls. Additionally, in the group of 32 patients and 16 controls, methylation

status of 58 CpGs was assessed by Infinium HumanMethylation450 BeadChip Assay (Illumina).

In the group of 452 Polish patients with Huntington's disease the number of CAG repeats in the mutated allele explained 75,1% of the variation in age of onset, while in the group of patients with $(CAG)_n \leq 50$ – 54,3%. Sex of the affected parent did not add significantly to the residual variation in AOO, not explained by $(CAG)_n$. In both groups a significant effect of the parental age of onset and the presence of HD in a parent on residual variation in AOO was identified.

While performing MSRE-qPCR molecular analyses a high overestimation of DNA methylation levels was observed if mock-digested samples were applied as the reference. This observation could result from the differences in the fragmentation of genomic DNA templates. The application of an alternative positive reference – DNA digested with a restriction enzyme that does not cut the examined amplicon, improved the PCR performance and the accuracy of quantitation. This approach results in normalized fragmentation of genomic DNA templates, so that the fragmentation of tested and control DNA templates is comparable.

The results of MSRE-qPCR and microarray analyses did not show significant differences between the average DNA methylation levels in HD patients and healthy controls. No significant correlations were observed between methylation level of selected CpGs and clinical and molecular features of Huntington's disease, which included: age of the patient, gender, disease duration, number of CAG repeats in the mutated allele, motor and functional scores. A significant impact of DNA methylation level on AOO was observed only for the cg05874888 in the Infinium microarray, located within the CpG shore in the *HTT* promoter. However, due to a small sample size, the presence of such association needs to be confirmed in a larger group of HD patients.

The results of performed analyses did not reveal an aberrant pattern of *HTT* gene methylation in Huntington's disease, as well as the involvement of genetic imprinting in the pathogenesis of the disease. In the examined group of Polish patients with HD, a dominant impact of CAG repeat length in the mutated allele on the age of onset was confirmed. The role of epigenetic modifications, such as DNA methylation within the CpG shore in the *HTT* promoter in the residual AOO variation cannot be excluded,

however it requires further studies. Examination of possible aberrations in *HTT* gene methylation and the role of *HTT* methylation in the pathogenesis of Huntington's disease is indicated in tissues, that are mostly affected in HD, such as neural tissue.

2. WYKAZ SKRÓTÓW

Geny i białka	
<i>ADORA2</i>	<i>adenosine A_{2A} receptor</i>
<i>ATXN2</i>	<i>ataxin-2</i>
<i>BDNF</i>	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
<i>CBP</i>	<i>CREB binding protein</i>
<i>CCND2</i>	<i>G1/S-specific cyclin D2 gene</i>
<i>DFFB</i>	<i>DNA fragmentation factor, 40-KD, beta subunit</i>
<i>DNMT</i>	<i>DNA methyltransferase</i>
<i>ESET</i>	<i>erg-associated protein with set domain</i>
<i>FMR1</i>	<i>fragile X mental retardation 1</i>
<i>FXN</i>	<i>frataxin</i>
<i>GRIK2</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, kainate 2</i>
<i>GRIN2A</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2A</i>
<i>GRIN2B</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate, subunit 2B</i>
<i>HAP1</i>	<i>huntingtin-associated protein 1</i>
<i>HDAC</i>	<i>histone deacetylase</i>
<i>HTT</i>	<i>huntingtin</i>
<i>HYPB</i>	<i>huntingtin interacting protein B</i>
<i>MAP2K6</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
<i>MAP3K5</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>
<i>MBD2</i>	<i>methyl-CpG binding domain protein 2</i>
<i>MECP2</i>	<i>methyl-CpG binding protein 2</i>
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>MTHFR</i>	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i>
<i>NES</i>	<i>nestin</i>
<i>PAX6</i>	<i>paired box gene 6</i>
<i>PCR2</i>	<i>polycomb repressive complex 2</i>
<i>PPARGC1A</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
<i>RASSF1A</i>	<i>ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1</i>
<i>UCHL1</i>	<i>ubiquitin carboxyl-terminal esteras L1</i>
<i>VMAT2</i>	<i>vesicular monoamine transporter 2</i>

Jednostki chorobowe	
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (<i>amyotrophic lateral sclerosis</i>)
FA	ataksja Friedreicha (<i>Friedreich ataxia</i>)
FraX	zespół łamliwego chromosomu X (<i>fragile X syndrome</i>)
HD	choroba Huntingtona (<i>Huntington's disease</i>)
JHD	postać młodzieńcza choroby Huntingtona (postać Westphala; <i>juvenile HD</i>)
SCA	ataksja rdzeniowo-mózdkowa (<i>spinocerebellar ataxia</i>)
Skale oceny zaawansowania choroby Huntingtona	
HADS-SIS	szpitalna skala lęku i depresji (<i>self-report-based Hospital Anxiety and Depression Scale combined with the Snaith Irritability Scale</i>)
HVLT-R	test Uczenia się Materiału Werbalnego Hopkinsa zrewidowany (<i>Hopkins Verbal Learning Test</i>)
PBA	skala zaburzeń behawioralnych (<i>Problem Behaviours Assessment</i>)
SDMT	<i>Symbol Digit Modalities Test</i>
SF	skala funkcjonowania
TFC	skala ogólnej sprawności funkcjonalnej (<i>Total Functional Capacity</i>)
TMS	skala oceny zaburzeń ruchowych (<i>Total Motor Score</i>)
UHDRS	<i>The Unified Huntington's Disease Rating Scale</i>
Metody laboratoryjne	
HPCE	wysokosprawna elektroforeza kapilarna (<i>high-performance capillary electrophoresis</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
MeDIP	immunoprecypitacja metylocytozyny (<i>methylated DNA immunoprecipitation</i>)
MS-MLPA	metylo-specyficzna amplifikacja multiplex zależna od ligacji sond molekularnych (<i>methylation-sensitive multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
MSP	metylo-specyficzny PCR (<i>methylation-specific PCR</i>)
MSRE-PCR	trawienie DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>methylation-sensitive restriction enzyme PCR</i>)
MSRE-qPCR	trawienie DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>methylation-sensitive restriction enzyme quantitative PCR</i>)
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji (<i>next generation sequencing</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, reakcja PCR w czasie rzeczywistym (<i>quantitative PCR, real-time PCR</i>)
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (<i>thin layer chromatography</i>)
WGBS	sekwencjonowanie całego genomu po reakcji z wodorosiarczynem sodu (<i>whole-genome bisulfite sequencing</i>)

Związki chemiczne	
(CAG) _n	liczba powtórzeń trójnukleotydu cytozyna - adenina - guanina
(CGG) _n	liczba powtórzeń trójnukleotydu cytozyna -guanina - guanina
5mC	5-metylocytozyna
ADP	adenozyno-5'-difosforan (<i>adenosine diphosphate</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (<i>adenosine triphosphate</i>)
CAG	trójnukleotyd cytozyna - adenina - guanina
CGG	trójnukleotyd cytozyna - guanina - guanina
CpG	dinukleotyd cytozyna-guanina (<i>C-phosphate-G</i>)
ddH ₂ O	woda podwójnie destylowana
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
GABA	kwas γ -aminomasłowy (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
miRNA	mikro-RNA (<i>microRNA</i>)
ncRNA	niekodujące cząsteczki RNA (<i>non-coding RNA</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (<i>ribonucleic acid</i>)
siRNA	krótki interferujący RNA (<i>small interfering RNA</i>)
Pozostałe skróty	
Δ Ct	różnica w cyklu granicznym w ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy
μ	mikro
3'UTR	region nieulegający translacji 3' (<i>3' untranslated region</i>)
5'UTR	region nieulegający translacji 5' (<i>5' untranslated region</i>)
ANOVA	analiza wariancji (<i>analysis of variance</i>)
AOMO	wiek, w którym u pacjenta pojawiły się pierwsze zaburzenia ruchowe (<i>age of motor onset</i>)
AOO	wiek zachorowania (<i>age of onset</i>)
ASE	specyficzna względem allelu ekspresja genu (<i>allele-specific expression</i>)
ASM	specyficzna względem allelu metylacja DNA (<i>allele-specific methylation</i>)
DMRs	regiony o odmiennym poziomie metylacji DNA (<i>differentially methylated regions</i>)
EHDN	Europejska Sieć Choroby Huntingtona (<i>European Huntington's Disease Network</i>)
F	wartość statystyki F
FDA	Agencja Żywności i Leków (<i>Food and Drug Administration</i>)
H3K4me3	trimetylacja lizyny w pozycji 4 histonu H3
H3K9m3	trimetylacja lizyny w pozycji 9 histonu H3
LINE	<i>long interspersed elements</i>

Ln	logarytm naturalny
MBD	domena rozpoznająca symetrycznie zmetylowane dinukleotydy CpG (ang. <i>methyl-CpG-binding domain</i>)
miRISC	indukowany przez miRNA kompleks wyciszający (<i>microRNA induced silencing complex</i>)
n	liczebność grupy
R ²	współczynnik determinacji
ORF	otwarta ramka odczytu (<i>open reading frame</i>)
p	poziom istotności
pz	par zasad
r.ż.	rok życia
RISC	indukowany przez RNA kompleks wyciszający (<i>RNA induced silencing complex</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
t	wartość statystyki t
TBZ	tetrabenazyna
UCK	Uniwersyteckie Centrum Kliniczne

3. WSTĘP

3.1. Choroba Huntingtona (HD)

3.1.1. Epidemiologia

Choroba Huntingtona (HD, ang. *Huntington's disease*) jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną dziedziczną w sposób autosomalny dominujący, spowodowaną mutacją dynamiczną w obrębie genu *HTT* (*IT15*). Rozpowszechnienie choroby na świecie jest zróżnicowane i w zależności od regionu geograficznego mieści się w granicach od 0.1 do 15 przypadków na 100 000 mieszkańców. Najwyższą częstość występowania HD obserwuje się w rejonie jeziora Maracaibo w Wenezueli, co jest prawdopodobnie wynikiem efektu założyciela. Poza tym wysoki współczynnik chorobowości, przekraczający 5/100 000, występuje w Ameryce Północnej, Europie i Australii. Wśród części krajów europejskich może on wynosić nawet 15/100 000. U rdzennych mieszkańców Azji Wschodniej i Afryki choroba Huntingtona występuje rzadko, z szacowaną częstością nieprzekraczającą 1/100 000 [Pringsheim i wsp., 2012]. Z danych literaturowych wynika, że obserwowane różnice etniczne w rozpowszechnieniu HD mogą wynikać z przynależności do określonych haplogrup mitochondrialnych, które są korelowane ze średnią liczbą trójnukleotydowych powtórzeń CAG w genie *HTT* [Warby i wsp., 2011].

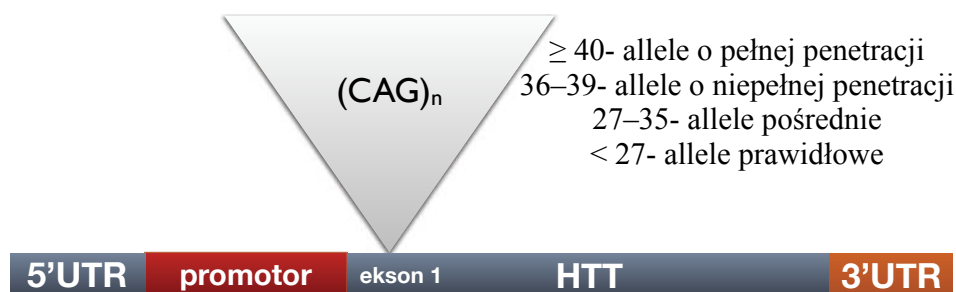
Szacuje się, że w Polsce żyje prawie 4 000 nosicieli mutacji w genie *HTT*. Według danych Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona (EHDN, ang. *European Huntington's Disease Network*) do sierpnia 2014 roku w badaniu REGISTRY EHDN zostało zarejestrowanych 961 polskich pacjentów, co klasyfikuje Polskę na piątym miejscu pod względem liczby uczestników tego badania w Europie [Zielonka i wsp., 2014].

Pomimo znacznego wzrostu rozpoznawalności choroby i dostępności badań genetycznych, diagnostyka choroby Huntingtona pozostaje nadal wyzwaniem dla lekarzy różnych specjalności. Przewiduje się, że liczba zachorowań będzie wzrastać w kolejnych latach, co jest związane ze starzeniem się populacji, a także obserwowanym wzrostem częstości mutacji *de novo* w genie *HTT*. Wzrost zachorowań dotyczyć będzie głównie postaci o późnym początku, charakteryzującej się łagodniejszym

fenotypem, z dominującymi w obrazie klinicznym zaburzeniami poznawczymi [Falush i wsp., 2001].

3.1.2. Podłoże molekularne

W 1983 roku zespół naukowców pod kierownictwem Jamesa Gusella zidentyfikował locus genu choroby Huntingtona w ramionach krótkich chromosomu 4 [Gusella i wsp., 1983]. Dziesięć lat później, na podstawie wyników badań dużej grupy chorych z Wenezueli, zmapowano gen *IT15* w locus 4p16.3 i opisano molekularne podłoże mutacji prowadzącej do rozwoju HD [The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993]. Gen *IT15*, obecnie nazywany genem *HTT*, koduje białko zwane huntingtyną. U pacjentów z HD występuje zwiększona liczba powtórzeń trójnukleotydu CAG ((CAG)_n) w pierwszym eksonie genu *HTT*, co wyraża się wydłużeniem poliglutaminowego łańcucha na N-końcu białkowego produktu. Prawidłowa liczba CAG nie przekracza wartości 35. U osób z (CAG)_n w zakresie 27–35 nie dochodzi do rozwoju HD, lecz istnieje ryzyko wystąpienia choroby u potomstwa [Semaka i wsp., 2006]. Wynika to z faktu, że allele te (zwane pośrednimi) charakteryzują się niestabilnością i może dojść do ich wydłużenia w czasie gametogenezy. Allele z liczbą CAG pomiędzy 36 a 39 są allelami o niepełnej penetracji i u części osób mogą ujawnić się fenotypowo. W przypadku liczby powtórzeń równej lub większej od 40 penetracja genu jest pełna (ryc. 1). U około 90% pacjentów z chorobą Huntingtona stwierdza się (CAG)_n w zakresie 40–55 [Shoulson i Young, 2011].



Ryc.1. Schemat budowy genu *HTT* z uwzględnieniem zakresów liczby powtórzeń trójnukleotydowych CAG ((CAG)_n), zlokalizowanych w pierwszym eksonie genu. UTR – ang. *untranslated region*

Wiek, w którym pacjenci zaczynają prezentować objawy HD koreluje z liczbą powtórzeń CAG w nieprawidłowym allelu, to znaczy im więcej jest tych powtórzeń tym choroba ujawnia się wcześniej i ma cięższy przebieg [Wexler i wsp., 2004; Ravina i wsp., 2008]. Zwiększenie liczby CAG podczas przekazywania zmutowanego genu potomstwu odpowiada za zjawisko antycypacji, które jest często obserwowane w HD. Antycypacja polega na wcześniejszym początku objawów i cięższym przebiegu klinicznym choroby w kolejnych pokoleniach i w przypadku HD wynika z niestabilności powtórzeń CAG w czasie gametogenezy. Zjawisko to występuje częściej w trakcie spermatogenezy. W większości przypadków, duże ekspansje, prowadzące do młodzieńczej postaci choroby (JHD, ang. *juvenile HD*) stwierdza się w potomstwie chorych mężczyzn [Gonzalez-Alegre i Afifi, 2006].

3.1.3. Toksyczność zmutowanej huntingtyny

Rola nieprawidłowej huntingtyny w patogenezie zmian neurodegeneracyjnych w HD nie została ostatecznie poznana. Huntingtyna (HTT) jest białkiem o złożonej, choć nie w pełni znanej funkcji, występującym w jądrze i cytoplazmie komórek różnych tkanek [Hoogeveen i wsp., 1993]. Uważa się, że w warunkach fizjologicznych białko to odgrywa szczególną rolę w embriogenezie układu nerwowego. HTT w jądrze komórkowym wiąże się z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi, działając jako regulator transkrypcji [Kegel i wsp., 2002]. W cytoplazmie komórek tworzy kompleksy z licznymi białkami, między innymi z mikrotubulami [Gauthier i wsp., 2004]. Do potencjalnych zadań HTT należy udział w transporcie wewnątrzkomórkowym, przekaźnictwie synaptycznym, endocytozie, procesach wydzielniczych i podziałach komórkowych [Ralser i wsp., 2005; Godin i wsp., 2010].

W wyniku mutacji dynamicznej w genie *HTT*, w zmutowanym białku dochodzi do zwielokrotnienia powtórzeń poliglutaminowych. Białko to tworzy nieprawidłową strukturę drugorzędową β -harmonijki, a następnie ulega wzmożonej proteolizie, prowadzącej do powstania krótkich, N- i C- końcowych fragmentów [Kim, 2013]. Produkty proteolizy zmutowanej huntingtyny mają tendencję do wzmożonej agregacji i tworzenia inkluzji cytoplazmatycznych i jądrowych. Produkty te zaburzają funkcję komórek poprzez złożone mechanizmy, między innymi hamowanie transkrypcji genów,

nieprawidłowe interakcje z białkami, zaburzenia gospodarki wapniowej, uszkodzenie mitochondriów i stres oksydacyjny [Smith i wsp., 2009; Szlachcic i wsp., 2015]. W patogenezie zmian neurodegeneracyjnych podkreśla się również udział transkryptu genu *HTT*, zawierającego nieprawidłową liczbę powtórzeń trójnukleotydowych. Udowodniono, że w chorobach poliglutaminowych zmutowany RNA tworzy toksyczne wewnątrzjądrowe agregaty [Li i wsp., 2008; de Mezer i wsp., 2011]. Ostatecznie, w wyniku tych złożonych mechanizmów dochodzi do apoptozy lub nekrozy komórki.

3.1.4. Obraz neuropatologiczny

Zaburzenia funkcji i struktury neuronów u pacjentów z HD udokumentowano już 10 lat przed szacowanym początkiem objawów ruchowych, wynikającym z liczby powtórzeń CAG. Za pomocą zaawansowanych technik obrazowych u pacjentów przedobjawowych wykazano zmiany w objętości mózgowia, obejmujące zanik jąder podstawy, ścieczenie kory mózgowej i istoty białej podkorowej [Tabrizi i wsp., 2009; ryc. 3]. Proces neurozwyrodnieniowy w chorobie Huntingtona obejmuje początkowo względnie selektywne uszkodzenie neuronów jądra ogoniastego i skorupy. Degeneracji ulegają w największym stopniu GABA-ergiczne neurony kolcowe drogi pośredniej układu pozapiramidowego, co stanowi podstawę do rozwoju płasawicy. Neurony pośrednie prążkowie są w znacznej mierze zaoszczędzone. Z czasem postępujący zanik i gliozą obejmują również neurony kolcowe drogi bezpośredniej, a także inne struktury ośrodkowego układu nerwowego, w tym istotę czarną siatkowatą, wzgórze, hipokamp, jądra głębokie mózdzku i korę mózgową. W zaawansowanych stadiach choroby u pacjentów obserwuje się uogólniony zanik korowo-podkorowy [Hadzi i wsp., 2012].

Dotychczas nie wyjaśniono mechanizmu, w jakim zmutowana huntingtyna uszkadza w największym stopniu neurony ośrodkowego układu nerwowego, z równoczesnym względnym zaoszczędzaniem innych tkanek. Wykazano, że białko *HTT* ulega ekspresji w wielu tkankach człowieka i innych ssaków [Li i wsp., 1993]. Początkowo uważano, że objawy pozanerwowe, takie jak utrata masy ciała i męczliwość mięśni wynikają pośrednio z uszkodzenia mózgu. W ostatnich latach opublikowano jednak liczne doniesienia, wskazujące na bezpośrednie uszkodzenie tkanek obwodowych przez produkty proteolizy zmutowanej huntingtyny. W badaniach

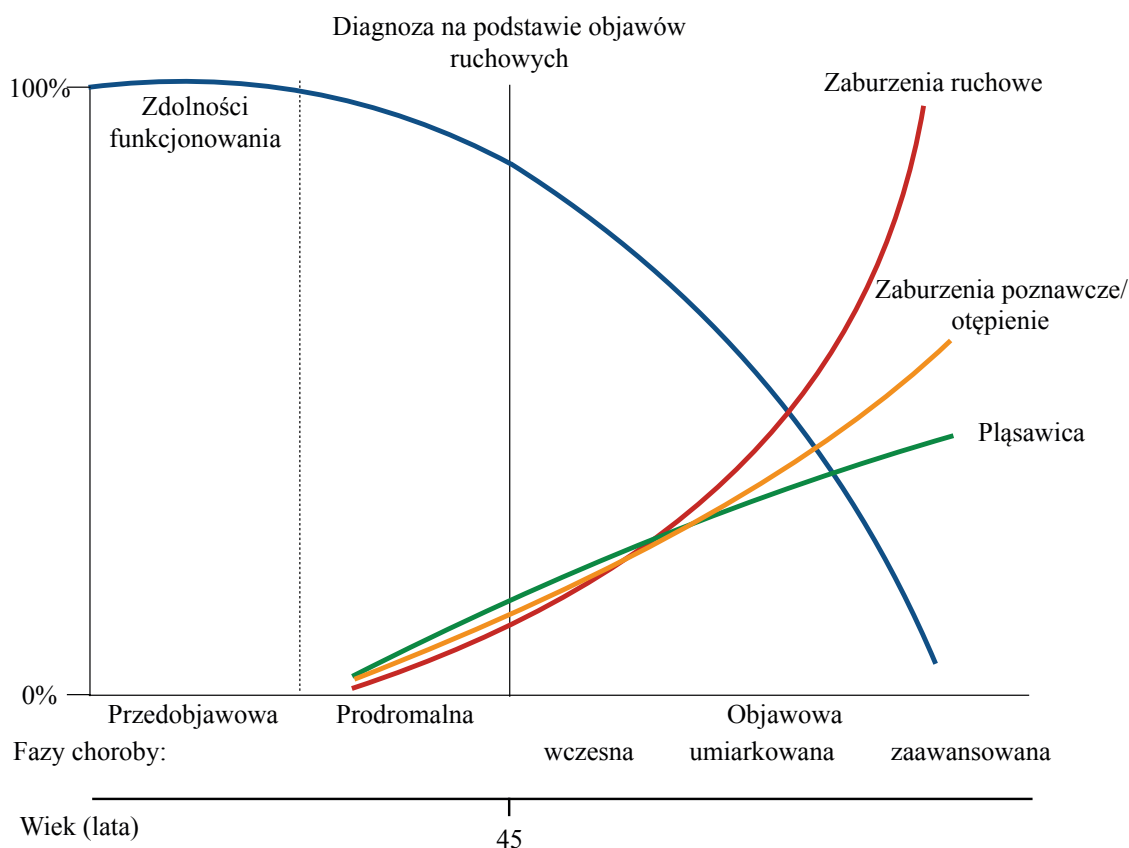
neuropatologicznych modeli zwierzęcych stwierdzono obecność charakterystycznych inkluzji wewnątrzkomórkowych HTT w tkankach obwodowych. Wykazano również cechy dysfunkcji mitochondriów i zaburzenia transkrypcji wielu genów w liniach komórkowych, pochodzących od pacjentów i myszy transgenicznych [Luthi-Carter i wsp., 2002; Panov i wsp., 2002; Almeida i wsp., 2008]. Objawy kliniczne, które mogą wynikać z bezpośredniego uszkodzenia tkanek obwodowych obejmują, między innymi utratę masy ciała, męczliwość mięśni, zanik jąder u mężczyzn, osteoporozę i zaburzenia immunologiczne [van der Burg i wsp., 2009].

3.1.5. Przebieg kliniczny choroby

U nosicieli mutacji w genie *HTT* pierwsze objawy kliniczne choroby występują najczęściej w wieku 35-44 lat, chociaż możliwe jest ich ujawnienie się pomiędzy pierwszym a nawet 80 rokiem życia. W przypadku zachorowania przed ukończeniem 20 lat choroba jest definiowana jako postać młodzieńcza HD (Westphala). Postać ta dotyczy 5-10% nosicieli mutacji i charakteryzuje się odmiennym obrazem klinicznym. U około 25% pacjentów pierwsze symptomy występują po 50 roku życia, co jest zazwyczaj związane z łagodniejszym fenotypem choroby [Bates i wsp., 2015].

Ustalenie wieku zachorowania (AOO, ang. *age of onset*) jest trudne, bowiem pacjenci mogą prezentować dyskretne objawy prodromalne wiele lat przed pojawieniem się typowych zaburzeń ruchowych. AOO definiuje się jako moment, w którym nosiciel mutacji w genie *HTT* rozwija jednoznaczne, niewytłumaczalne innymi przyczynami objawy choroby Huntingtona [Orth i Schwenke, 2011]. Najbardziej wiarygodne jest oszacowanie wieku zachorowania, gdy u pacjenta pierwszą manifestacją choroby są ruchowe objawy pozapiramidowe [Hogarth i wsp., 2005]. Naturalny przebieg HD obejmuje występowanie fazy przedobjawowej, prodromalnej i objawowej [Ross i wsp., 2014; ryc. 2]. Na podstawie obrazu klinicznego wyróżnia się cztery podstawowe grupy objawów klinicznych, tj.: objawy ruchowe, poznawcze, behawioralne i psychiatryczne. W okresie prodromalnym mogą wystąpić dyskretne zmiany osobowości, drażliwość, obniżenie nastroju, utrata masy ciała oraz łagodne deficyty poznawcze. Często obserwuje się również zaburzenia koordynacji ruchowej i nieprawidłowości sakadycznych ruchów gałek ocznych [Sławek i wsp., 2013]. U 2/3 liczby pacjentów pierwsze typowe

objawy HD, pozwalające na postawienie diagnozy klinicznej, to zaburzenia ruchowe pod postacią płasawicy. U pozostałej 1/3 liczby chorych pierwszą manifestacją choroby są objawy psychiatryczne [Bates i wsp., 2015].



Ryc. 2. Naturalny przebieg choroby Huntingtona. U pacjentów przedobjawowych nie obserwuje się objawów HD. W fazie prodromalnej mogą występować dyskretne zaburzenia ruchowe, psychiatryczne i behawioralne, które poprzedzają postawienie diagnozy choroby, opartej głównie na charakterystycznych ruchach płasawicznych. W fazie objawowej HD do objawów płasawicy dołączają stopniowo inne zaburzenia ruchowe oraz postępujące deficyty poznawcze [schemat wg Ross i wsp., 2014].

3.1.5.1. Zaburzenia ruchowe

Objawy choroby ruchu w HD można ogólnie podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa obejmuje ruchy mimowolne, z których najbardziej charakterystyczna jest płasawica. Do drugiej grupy należą zaburzenia ruchów dowolnych, w tym między innymi zaburzenia koordynacji ruchowej i bradykinezja. Wczesne objawy motoryczne w HD obejmują zaburzenia koordynacji i niezgrabność ruchów, nadmierne gesty

i manieryzmy. W badaniu ruchomości gałek ocznych obserwuje się wydłużenie latencji dowolnych sakad oraz zaburzenia płynności wodzenia oczami za przedmiotem, często spowodowane przez wtrącane sakady. Charakterystyczna jest niemożność utrzymania wykonywanych ruchów, na przykład wysuniętego z ust języka lub uścisku dłoni. U większości pacjentów, pierwszym objawem ruchowym zauważalnym przez chorego lub jego otoczenie jest płasawica. Początkowo ma ona charakter ogniskowy, z dalszą tendencją do uogólniania się. Ruchy płasawicze nasilają się w ciągu pierwszych dziesięciu lat objawowej HD, występują trwale podczas okresów czuwania pacjenta i nasilają się pod wpływem stresu. Płasawica powoduje niestabilność postawy ciała i chodu, prowadząc niekiedy do upadków i obrażeń ciała. Wraz z postępem choroby dołączają się także inne zaburzenia pozapiramidowe, dotyczące zarówno ruchów dowolnych jak i mimowolnych. Objawy te obejmują ruchy dystoniczne, mioklonie, oczopląs optokinetyczny, dyzartrię, hipofonię, spowolnienie ruchowe i sztywność mięśni. W zaawansowanych stadiach choroby ruchy płasawicze zanikają, a w obrazie klinicznym zaznacza się przewaga objawów parkinsonowskich. Występuje dysfagia, afazja, ciężka bradykinezja oraz znaczny niedobór masy ciała. W badaniu fizykalnym pacjentów w późnych stadiach HD, obok objawów pozapiramidowych, zaznaczone są również objawy piramidowe, takie jak klonus, spastyczność i objaw Babińskiego [Sławek i wsp., 2013]. W postaci młodzieńczej parkinsonizm dominuje w obrazie klinicznym od początku choroby. Dodatkowo mogą występować objawy, których nie obserwuje się w klasycznej postaci, takie jak: opóźnienie rozwoju psychoruchowego, napady padaczkowe, nasilone objawy mózdkowe i szybka progresja zaburzeń poznawczych [Nance i Myers, 2001].

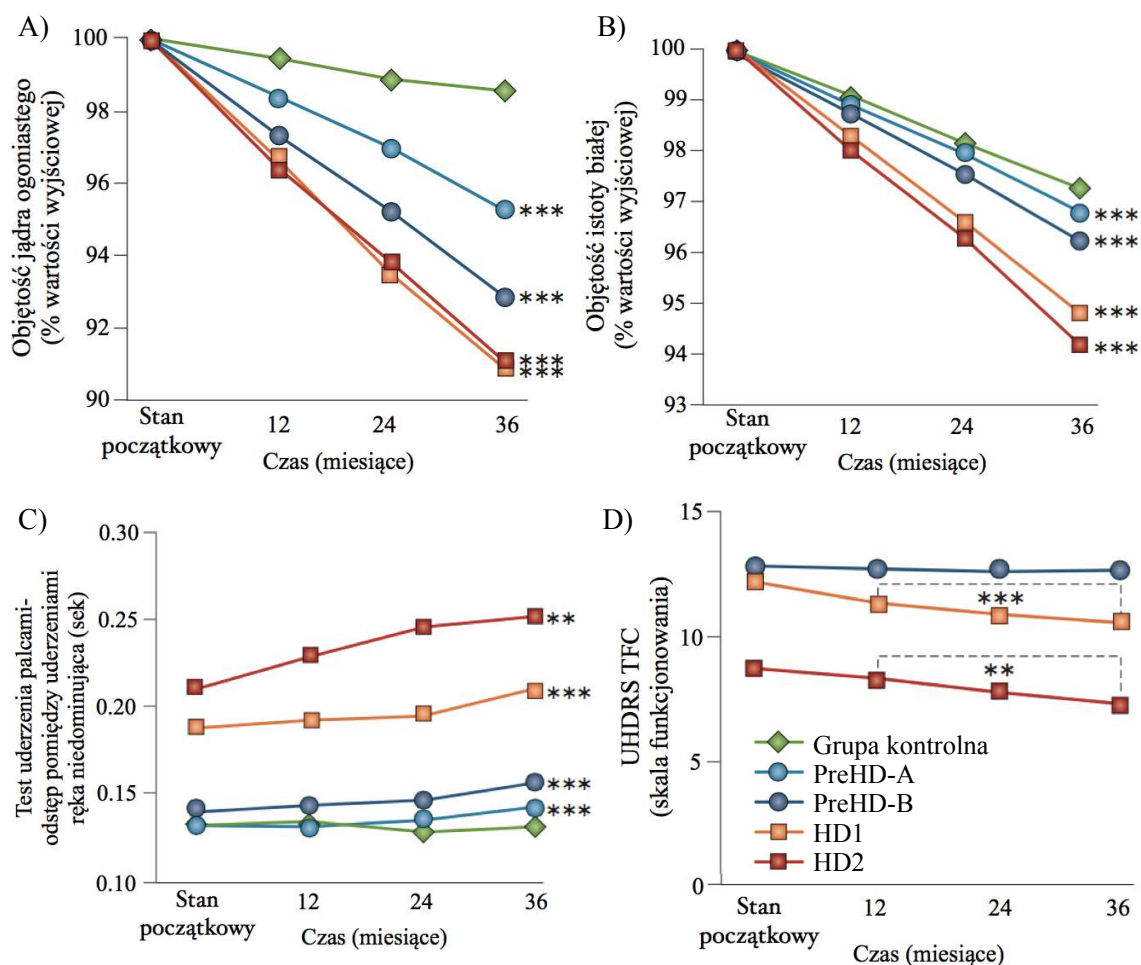
3.1.5.2. Zaburzenia funkcji poznawczych

U nosicieli mutacji w genie *HTT* można zaobserwować dyskretne obawy poznawcze już 9-15 lat przed klinicznym rozpoznaniem HD. Zaburzenia te charakteryzują się stopniową, nieuchronną progresją w czasie. Początkowo obejmują najczęściej upośledzenie funkcji wykonawczych, takich jak inicjowanie działań, organizowanie i ustalanie ich celów, dostrzeganie błędów oraz przerzutność uwagi. U pacjentów występuje upośledzona elastyczność myślenia, czyli gotowość do zmiany sposobu myślenia

w danej sytuacji. Zaburzenia pamięci dotyczą głównie pamięci orientacyjnej i proceduralnej. Chorzy mają trudności z dokonywaniem obliczeń w pamięci, zapamiętywaniem nowych informacji oraz obsługą nowych przedmiotów. W przeciwieństwie do otępienia występującego w chorobie Alzheimera, pacjenci z HD nie mają deficytu typowo amnestycznego i z podobnym trudem odtwarzają informacje z przeszłości, bez względu na gradient czasowy. Względnie dobrze zachowane są również funkcje językowe [Stout i wsp., 2011]. Charakterystyczny jest częsty brak świadomości objawów, zarówno poznawczych jak i ruchowych [Sitek i wsp., 2011]. Postępujący proces neurodegeneracyjny prowadzi z czasem do otępienia, które jest nieodłącznym elementem obrazu klinicznego zaawansowanej choroby.

3.1.5.3. Objawy psychiatryczne i behawioralne

Objawy psychiatryczne i behawioralne, w przeciwieństwie do zaburzeń ruchowych oraz poznawczych, charakteryzuje większe zróżnicowanie i brak wyraźnej tendencji do nasilania się podczas trwania choroby [Anderson i Marder, 2001]. Najczęstszym objawem jest depresja, która występuje u ponad połowy pacjentów, już w okresie poprzedzającym ujawnienie się symptomów ruchowych [Julien i wsp., 2007]. Do wczesnych zaburzeń psychiatrycznych należy również labilność emocjonalna, drażliwość, apatia, wzmożony poziom lęku oraz problemy z rozpoznawaniem emocji u innych osób. U części pacjentów, na różnych etapach choroby, mogą pojawić się zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne i objawy psychotyczne, najczęściej omamy i urojenia. Występuje tendencja do zachowań agresywnych i nadużywania substancji psychoaktywnych, a także zwiększone ryzyko prób samobójczych. Okresem krytycznym dla podjęcia próby samobójczej jest moment poprzedzający otrzymanie wyniku badania genetycznego oraz czas, w którym dochodzi do utraty niezależności chorego w codziennym funkcjonowaniu [Paulsen i wsp., 2005]



Ryc. 3. Wybrane zmiany w obrazie klinicznym i neuropatologicznym przedobjawowej oraz wczesnej fazy choroby Huntingтона, stwierdzone w prospektywnym badaniu TRACK-HD. **A)** i **B)** – zmiany w objętości jądra ogoniastego i istoty białej; **C)** – test uderzenia palcami, służący do oceny wczesnych zaburzeń ruchowych; **D)** skala TFC. *oznacza poziom istotności statystycznej (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). **PreHD-A** – przedobjawowi nosiciele mutacji >10 lat od szacowanego wieku zachorowania; **PreHD-B** – przedobjawowi nosiciele mutacji <10 lat od szacowanego wieku zachorowania; **HD1** – pacjenci we wczesnej fazie objawowej z 11-13 pkt w skali TFC; **HD2** – pacjenci we wczesnej fazie objawowej z 7-10 pkt w skali TFC; **UHDRS** – The Unified Huntington’s Disease Rating Scale; **TFC** – Total Functional Capacity [Tabrizi i wsp., 2013]

3.1.6. Skale oceny klinicznej zaawansowania choroby

Najczęściej stosowanym narzędziem do oceny zaawansowania choroby Huntingtona, zarówno w praktyce klinicznej, jak i w badaniach naukowych jest skala UHDRS (ang. *The Unified Huntington's Disease Rating Scale*). Skala ta uwzględnia objawy motoryczne, poznawcze, zaburzenia zachowania oraz poziom funkcjonowania chorego [Huntington Study Group, 1996]. Parametry oceniane za pomocą UHDRS przedstawiono w tab. 1. W ramach badania REGISTRY Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona do oceny klinicznej pacjentów stosowano szereg powszechnie znanych skal, takich jak: Skala Depresji Hamiltona, Skala Depresji Becka, Kwestionariusz Oceny Jakości Życia SF-36. Celem zwiększenia rzetelności i trafności wprowadzonych danych oraz ich użyteczności w próbach klinicznych zespół ekspertów EHDN opracował zmodyfikowane kwestionariusze, dedykowane dla pacjentów z HD. Do oceny zaburzeń behawioralnych rekomendowane jest zastosowanie skali PBA (ang. *Problem Behaviours Assessment*) oraz skali HADS-SIS (ang. *self-report-based Hospital Anxiety and Depression Scale combined with the Snaith Irritability Scale*). Bateria testów zalecanych przez EHDN do badania neuropsychologicznego obejmuje próby fluencji fonologicznej, Skalę Demencji Mattisa, Test Uczenia się Materiału Werbalnego Hopkinsa zrewidowany (HVLT-R, ang. *Hopkins Verbal Learning Test*), Test SDMT (ang. *Symbol Digit Modalities Test*), Test Stroopa, Test Łączenia Punktów oraz próbę fluencji semantycznej. Należy zaznaczyć, że wymienione testy mogą być przeprowadzane jedynie przez wykwalifikowany personel, w innym wypadku zaleca się stosowanie kwestionariusza UHDRS. Oprócz wymienionych skal, w bazie EHDN gromadzonych jest szereg dodatkowych informacji, obejmujących dane demograficzne i społeczne, wynik badania molekularnego, wywiad rodzinny, przyjmowane leki, choroby współistniejące, kwestionariusz opiekuna lub osoby towarzyszącej, a także wiek pojawienia się objawów klinicznych u chorego i pewność z jaką badacz określił AOO. Stałe doskonalenie narzędzi do oceny klinicznej HD oraz regularne szkolenia badaczy pracujących w ośrodkach EHDN umożliwiają czułą i rzetelną ocenę parametrów choroby, co ma kluczowe znaczenie w badaniach klinicznych i naukowych.

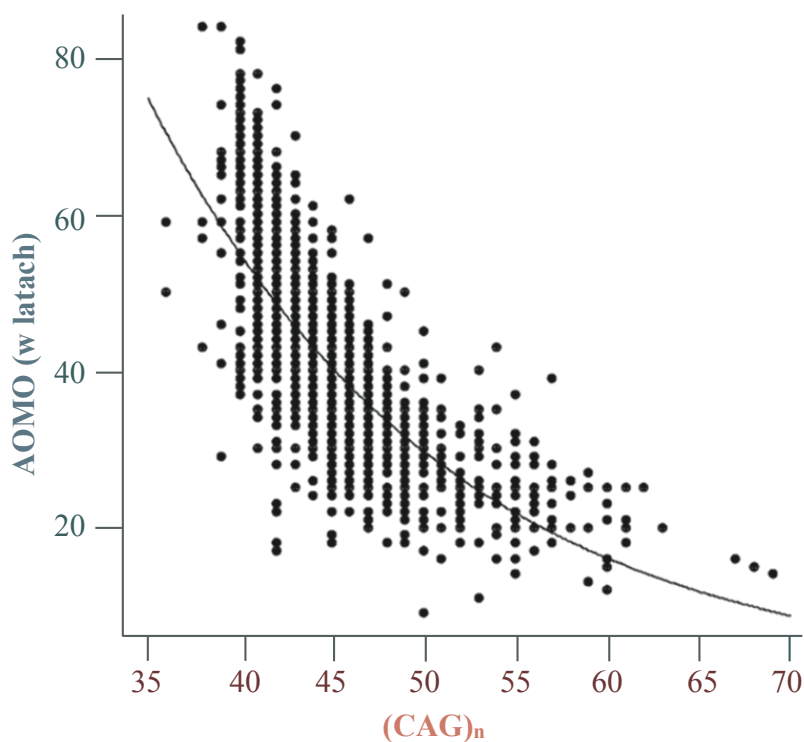
Tab. 1. Parametry kliniczne oceniane w skali UHDRS (ang. *The Unified Huntington's Disease Rating Scale*)

Skala Ruchowa (TMS)	Skala Funkcjonowania	Skala Niezależności w %
Wodzenie oczami za przedmiotem	Czy pacjent mógłby nająć się do pracy, przynoszącej zyski, którą wykonywał uprzednio?	100 = pomoc niepotrzebna
Zapoczątkowanie ruchu sakadowego	Czy pacjent mógłby podjąć się jakiegokolwiek przynoszącej zyski pracy?	90 = pomoc fizyczna niepotrzebna jeśli unikane są trudne zadania
Prędkość ruchu sakadowego	Czy pacjent mógłby podjąć się jakiegokolwiek pracy jako wolontariusz lub innej nieprzynoszącej zysków?	80 = przedchorobowy poziom zmian w zatrudnieniu lub jego zakończenie; nie potrafi wykonać obowiązków domowych jak w okresie przed pojawieniem się objawów, może potrzebować pomocy z finansami
Dyzartria	Czy pacjent mógłby samodzielnie zarządzać swoimi środkami finansowymi (miesięcznymi) bez żadnej pomocy?	70 = utrzymana samodzielność przy kąpieli, ograniczone wykonywanie obowiązków domowych, np. gotowanie i użycie noża, zakończone prowadzenie pojazdu; niezdolny do zarządzania środkami finansowymi
Wystawianie języka	Czy pacjent mógłby robić zakupy produktów spożywczych bez pomocy?	60 = potrzebuje minimalnej pomocy przy ubieraniu się, toalecie, kąpieli; jedzenie musi być pokrojone dla pacjenta
Uderzenia palcami	Czy pacjent mógłby posłużyć się pieniędzmi jako kupujący w prostych transakcjach w sklepie?	50 = odpowiedni 24-godzinny nadzór; wymagana pomoc przy kąpieli, jedzeniu, toalecie
Nawracanie/odwracanie rąk	Czy pacjent mógłby nadzorować dzieci bez pomocy?	40 = potrzebna ciągła opieka; ograniczona zdolność samodzielnego spożycia posiłku, płynna dieta
Luria	Czy pacjent mógłby bezpiecznie i samodzielnie prowadzić pojazd?	30 = pacjent pomaga minimalnie przy karmieniu, kąpieli, toalecie
Sztynność- kończyny górne	Czy pacjent mógłby wykonać prace domowe bez pomocy?	20 = nie mówi, musi być karmiony
Bradykinezja-ciało	Czy pacjent mógłby wyprać swoje rzeczy (pranie/suszenie) bez pomocy?	10 = karmienie dojelitowe, całkowita opieka przyłóżkowa
Maksymalna dystonia	Czy pacjent mógłby przygotować sobie posiłek bez pomocy?	Skala Zaburzeń Zachowania
Maksymalna płasawica	Czy pacjent mógłby posłużyć się telefonem bez pomocy?	Nastroje depresyjne
Chód	Czy pacjent mógłby pobierać swoje leki bez pomocy?	Niskie poczucie własnej wartości/poczucie winy
Chód stopa za stopą	Czy pacjent mógłby spożyć posiłek bez pomocy?	Lęk
Test pociągnięcia do tyłu (retropulsji)	Czy pacjent mógłby ubrać się bez pomocy?	Myśli samobójcze
Skala Funkcji Poznawczych	Czy pacjent mógłby wykopać się bez pomocy?	Zachowanie destrukcyjne lub agresywne
Test Fluencji Słownej	Czy pacjent mógłby skorzystać ze środków transportu publicznego bez pomocy?	Drażliwość
Testy Stroopa	Czy pacjent mógłby chodzić do miejsc w sąsiedztwie bez pomocy?	Persewercja/myśli obsesyjne
Symbol Digit Modalities Test	Czy pacjent jest w stanie chodzić bez upadków?	Zachowania kompulsywne
Skala TFC (Total Funcional Capacity)	Czy pacjent mógłby chodzić bez pomocy?	Urojenia
Zawód	Czy pacjent może uczesać się bez pomocy?	Omamy
Finanse	Czy pacjent może przejść pomiędzy krzesłami bez pomocy?	Czy według badającego pacjent jest splątany?
Prace domowe	Czy pacjent może wejść i wyjść z łóżka bez pomocy?	Czy według badającego pacjent jest otepiła?
Czynności dnia codziennego	Czy pacjent może korzystać z toalety/umywalki bez pomocy?	Czy według badającego pacjent ma depresję?
Poziom opieki	Czy opieka nad pacjentem może być zapewniona w domu?	Czy uczestnik badania wymaga farmakoterapii w leczeniu depresji?

3.1.7. Czynniki modyfikujące wiek pojawienia się objawów HD

Pomimo, że choroba Huntingtona ujawnia się najczęściej w czwartej lub w piątej dekadzie życia, w literaturze opisano zakresy wieku zachorowania od pierwszego do nawet 80 roku życia. Uważa się, że za około 50-70% zmienności w wieku pojawienia się objawów choroby odpowiada liczba powtórzeń CAG w nieprawidłowym allelu *HTT* [Rosenblatt i wsp., 2001; Wexler i wsp., 2004]. Korelacja ta ma charakter odwrotny, to znaczy im więcej jest powtórzeń CAG tym choroba ujawnia się wcześniej i ma cięższy przebieg. Przykładowo, osoba z liczbą powtórzeń równą 40 ma 3% ryzyka, że rozwinię objawy choroby przed 45 rokiem życia, natomiast osoba z liczbą powtórzeń 50– 75% [Langbehn i wsp., 2004]. Postać młodzieńcza HD (JHD, ang. *Juvenile HD*) jest definiowana poprzez wystąpienie AOO przed 20 rokiem życia i występuje u 5%-10% nosicieli mutacji. Postać ta różni się od klasycznej HD nasilonymi deficytami poznawczymi, opóźnieniem rozwoju psychoruchowego, ciężką bradykinezją oraz występowaniem u części chorych napadów padaczkowych. U większości pacjentów z JHD stwierdza liczbę powtórzeń CAG powyżej 60 [Nance i Myers, 2001].

Pomimo silnej korelacji AOO z liczbą CAG, obserwuje się istotne różnice pomiędzy wiekiem zachorowania u pacjentów z tą samą liczbą powtórzeń, nawet w obrębie jednej rodziny [Gusella i MacDonald, 2009]. Obserwacje te stały się powodem poszukiwań genetycznych i środowiskowych czynników modyfikujących wiek zachorowania i przebieg kliniczny HD. Na podstawie badań dużej grupy chorych z Wenezueli ustalono, że w zależności od analizowanych zakresów CAG, za około 50-70% zmienności w wieku zachorowania odpowiada liczba CAG w nieprawidłowym allelu *HTT*. Wśród pozostałych 30-50%, czynniki środowiskowe stanowią 60%, natomiast czynniki genetyczne – 40% [Wexler i wsp., 2004]. W innym badaniu czynniki dziedziczne odpowiadały za 56% rezydualnej zmienności w wieku wystąpienia objawów neurologicznych [Djousse i wsp., 2003; ryc. 4]. Korelacja pomiędzy liczbą CAG a wiekiem pojawienia się objawów choroby jest silniejsza w grupie pacjentów z liczbą powtórzeń powyżej 44, w porównaniu do grupy pacjentów z $(CAG)_n < 44$. Sugeruje to większe znaczenie modyfikujących czynników środowiskowych i genetycznych w grupie chorych z krótszymi allelami [Gusella i MacDonald, 2009].



Ryc. 4. Zależność pomiędzy liczbą powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) a wiekiem pojawienia się objawów ruchowych HD (AOMO, ang. *age of motor onset*). Rycina przedstawia dane pochodzące od 1200 pacjentów. W powyższym badaniu liczba CAG wyjaśniała 67% zmienności w AOMO, a za 56% pozostałej zmienności odpowiedzialne były inne czynniki dziedziczne [Djousse i wsp., 2003].

Dotychczas opublikowano liczne doniesienia, w których wykazano statystycznie istotny wpływ polimorfizmów różnych genów na wiek pojawienia się objawów i przebieg HD. Wśród genów zaangażowanych w patogenezę choroby wymienia się między innymi geny, których produkty biorą udział w neuroprzekaznictwie (*GRIK2*, *GRIN2A*, *GRIN2B*), transporcie aksonalnym (*HAPI*), apoptozie (*DFFB*, *MAP3K5*, *MAP2K6*), ubikwitynylacji (*UCHL1*), przemianach kwasu foliowego (*MTHFR*) i metabolizmie energii (*PPARGC1A*). Nadal jednak ich potencjalny udział w patogenezie HD pozostaje dyskusyjny, ponieważ wiele z tych zależności nie zostało potwierdzonych na większej grupie badanych. Dodatkowo, nie wykazano w jakim mechanizmie zbadany polimorfizm miałby wpływać na proces neurodegeneracji w HD [Gusella i MacDonald, 2009].

Wśród opisywanych w literaturze czynników modyfikujących na uwagę zasługuje również somatyczna niestabilność nieprawidłowego allele *HTT*, prowadząca do zwiększenia liczby CAG podczas podziałów neuronów [Swami i wsp., 2009], jak również procesy epigenetyczne, zwłaszcza metylacja DNA i modyfikacje potranslacyjne histonów. Poszukiwanie mechanizmów epigenetycznych wpływających na ekspresję genów pozostaje przedmiotem badań wielu projektów badawczych, w tym projektów z zakresu chorób neurodegeneracyjnych.

3.1.8. Leczenie objawowe

Pomimo licznych prób klinicznych przeprowadzonych wśród pacjentów z HD, jak dotąd nie jest możliwe spowolnienie lub zatrzymanie postępującego procesu neurozwyrodnieniowego, a postępowanie sprowadza się głównie do leczenia objawowego. Obok leczenia farmakologicznego, istotnym elementem wielospecjalistycznej opieki nad pacjentem jest wsparcie psychologiczne, rehabilitacja oraz poradnictwo genetyczne dla nosicieli mutacji i członków ich rodzin. Celem leczenia farmakologicznego jest poprawa w zakresie objawów utrudniających codzienne funkcjonowanie chorego i poprawa jakości życia. W leczeniu płasawicy stosuje się leki zmniejszające aktywność układu dopaminergicznego, z których w praktyce klinicznej najczęściej stosowane są klasyczne i atypowe neuroleptyki. Preparatem, zarejestrowanym przez Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) do leczenia objawowego płasawicy jest tetrabenazyna (TBZ). TBZ jest inhibitorem wychwytu zwrotnego monoamin w zakończeniach presynaptycznych neuronów ośrodkowego układu nerwowego, poprzez odwracalne wiązanie się z pęcherzykowym transporterem monoamin typu 2 (VMAT2, ang. *vesicular monoamine transporter 2*). Skuteczność tego leku w leczeniu płasawicy została dobrze udokumentowana, lecz jego szerokie zastosowanie u pacjentów ogranicza stosunkowo częste występowanie działań niepożądanych, między innymi senności, obniżenia nastroju, dysfagii i objawów parkinsonizmu. Wśród pozostałych zaburzeń ruchowych w łagodzeniu objawów dystonii skuteczne jest zastosowanie toksyny botulinowej, podczas gdy w leczeniu mioklonii- leki przeciwpadaczkowe i benzodiazepiny [Bonelli i Wenning, 2006].

Jak dotąd nie wykazano skuteczności żadnego leku w terapii zaburzeń poznawczych wśród pacjentów z chorobą Huntingtona. Zasady leczenia objawowego depresji i innych zaburzeń neuropsychiatrycznych nie różnią się od zasad leczenia w przypadkach sporadycznych tych chorób. Stosuje się głównie selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne oraz neuroleptyki [Sławek i wsp., 2013].

3.2. Epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów

Procesy epigenetyczne są to zmiany w obrębie materiału genetycznego, które prowadzą do wyciszenia aktywności transkrypcyjnej genów, bez zmiany ich pierwotnej sekwencji nukleotydów [Siedlecki, 2011]. W przeciwieństwie do kodu genetycznego, uniwersalnego dla wszystkich komórek organizmu, informacja epigenetyczna charakteryzuje się dużą różnorodnością tkankową i zmiennością w czasie. Różnorodność ta odpowiada za odmienny profil ekspresji genów w komórkach, dzięki czemu dochodzi do różnicowania się tkanek i narządów o swoistej morfologii i funkcji. Do najczęściej obserwowanych zmian epigenetycznych należy metylacja DNA oraz modyfikacje potranslacyjne histonów. Do kategorii modyfikacji epigenetycznych zalicza się również procesy, które odpowiadają za tzw. remodeling chromatyny, a także regulację ekspresji genów przez niekodujące cząsteczki RNA (ncRNA, ang. *non-coding RNA*). Charakterystyczną cechą tych procesów, w przeciwieństwie do zmian w genomie, jest ich potencjalna odwracalność, co budzi nadzieje na ich wykorzystanie w prewencji i leczeniu różnych schorzeń [Dulac, 2010].

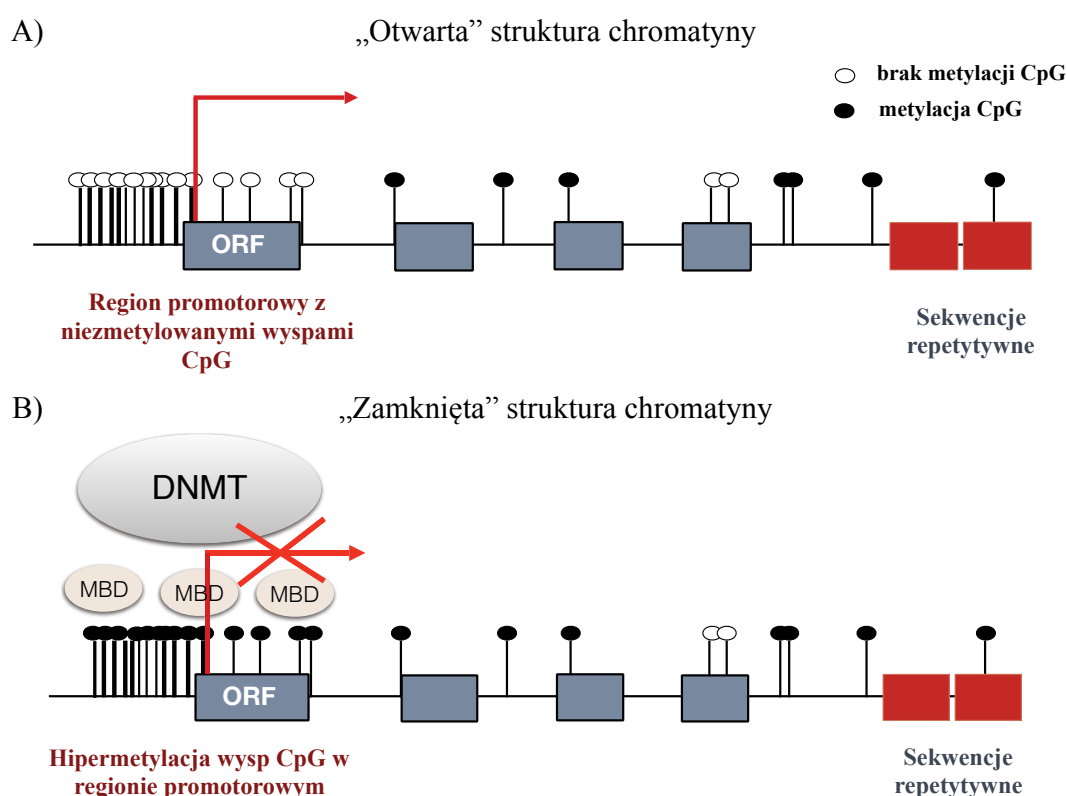
3.2.1. Metylacja DNA

Podstawową zmianą epigenetyczną, prowadzącą do wyciszenia aktywności transkrypcyjnej genu jest metylacja wysp CpG w rejonie promotorowym [Bird, 2002]. Metylacja DNA polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej do zasady azotowej nukleotydu. Grupa ta przyłączana jest najczęściej do cytozyny znajdującej się w dinukleotydowych sekwencjach CpG (ang. *C-phosphate-G*) i prowadzi do powstania 5-metylocytozyny (5mC). Reakcja jest katalizowana przez enzymy należące do rodziny metylotransferaz DNA (DNMT, ang. *DNA methyltransferases*), wśród których DNMT1

odpowiada za utrwalenie wzoru metylacji podczas replikacji, a DNMT3A i DNMT3B za metylację DNA *de novo*. Dinukleotydy CpG mogą być rozproszone w genomie lub tworzyć skupiska, nazywane wyspami CpG. Ogółem w genomach ssaków, za wyjątkiem wysp CpG, większość cytozyn w sekwencjach CpG jest wysoce zmetylowanych. Modyfikacja ta dotyczy w największym stopniu regionów niekodujących, takich jak: sekwencje repetytywne, transpozony i endogenne retrowirusy, na przykład sekwencje LINE (ang. *long interspersed elements*) i Alu. Celem metylacji tych sekwencji jest wyciszenie ich transkrypcji oraz zachowanie stabilności genomu [Suzuki i Bird, 2008; Urdinguio i wsp., 2009; ryc. 5].

Wyspy CpG są sekwencjami nukleotydowymi o długości powyżej 200 par zasad, o zawartości guaniny i cytozyny powyżej 50% i współczynniku CpG obserwowanych do CpG oczekiwanych, przekraczającym 0,6 [Gardiner-Garden i Frommer, 1987]. W ludzkim genomie są one najczęściej zlokalizowane w proksymalnych regionach promotorowych genów i na ogół nie ulegają metylacji. Umożliwia to wiązanie czynników transkrypcyjnych i innych białek, których obecność jest konieczna do zapoczątkowania aktywnej transkrypcji genu. Metylacja wysp CpG odgrywa w warunkach fizjologicznych znaczącą rolę w różnicowaniu komórek podczas rozwoju zarodkowego, poprzez regulację tkankowo specyficznej ekspresji genów. Odpowiada również za zjawisko imprintingu genomowego oraz inaktywację chromosomu X u kobiet [Siedlecki, 2011]. Po zapłodnieniu, w stadium wczesnego zarodka, dochodzi do globalnej demetylacji DNA, a następnie ustanowienia nowego, podstawowego profilu metylacji CpG, przy udziale metylotransferaz DNMT3A i DNMT3B [Kafri i wsp. 1992]. Ten podstawowy wzór metylacji DNA, utworzony w stadium blastocysty ulega następnie dalszym zmianom, obejmującym zarówno metylację *de novo* jak i demetylację [Weber i wsp., 2007]. Udowodniono, że wprowadzenie metylacji DNA, jak również jej podtrzymywanie w kolejnych rundach replikacyjnych jest niezbędne dla prawidłowej embriogenezy, gdyż zahamowanie ekspresji metylotransferaz DNA u myszy jest letalne we wczesnych etapach rozwoju [Li i wsp., 1992]. Mechanizm wyciszania aktywności transkrypcyjnej genów związany z metylacją DNA może mieć charakter bezpośredni, poprzez hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA II do miejsc startu transkrypcji lub pośredni, poprzez interakcje

z innymi białkami. Do białek zaangażowanych w hamowanie transkrypcji hipermetylowanego genu należą między innymi białka zawierające domenę MBD (ang. *methyl-CpG-binding domain*), która rozpoznaje symetrycznie zmetylowane dinukleotydy CpG. Białka te mogą inicjować dalsze procesy epigenetyczne związane z regulacją ekspresji genu, obejmujące modyfikacje białek histonowych i remodeling chromatyny [Bogdanović i Veenstra, 2009].



Ryc. 5. Wpływ metylacji DNA na aktywność transkrypcyjną genu. **A)** – niezmetrylowane wyspy CpG, zlokalizowane w sekwencjach promotorowych, są związane z otwartą strukturą chromatyny i umożliwiają aktywną transkrypcję genu. **B)** – hipermetylacja wysp CpG w regionie promotorowym prowadzi do wyciszenia transkrypcyjnego genu poprzez hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA II do miejsc startu transkrypcji oraz interakcje z innymi białkami. **ORF** – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*); **DNMT** – metylo-transferaza DNA (ang. *DNA methyltransferase*); **MBD** – białka zawierające domenę, rozpoznającą symetrycznie zmetylowane dinukleotydy CpG (ang. *methyl-CpG-binding domain*) [zmodyfikowano na podstawie Urduingio i wsp., 2009]

3.2.2. Modyfikacje potranslacyjne histonów

Kolejnym mechanizmem kontroli ekspresji genów jest zmiana dostępności chromatyny dla aparatu transkrypcyjnego, związana z regulacją jej struktury przestrzennej (tzw. remodeling chromatyny). Czynniki wpływające na stopień kondensacji chromatyny obejmują modyfikacje potranslacyjne histonów, a także działanie kompleksów białkowych, wykorzystujących hydrolizę ATP do pozycjonowania nukleosomów [Ho i Crabtree, 2010]. Histony podlegają różnorodnym, na ogół odwracalnym, modyfikacjom potranslacyjnym, między innymi acetylacji, metylacji, fosforylacji, sumoilacji, ADP-rybozylacji i ubikwitynylacji. Ich znaczenie w regulacji transkrypcji polega na zmianie struktury przestrzennej chromatyny, a także oddziaływaniu z innymi kompleksami białkowymi. W zależności od rodzaju i umiejscowienia w łańcuchu aminokwasowym, modyfikacje histonów mogą aktywować lub wyciszać transkrypcję genu (tab. 2). Enzymami katalizującymi reakcję odwracalnej acetylacji i metylacji histonów są histonowe acetylotransferazy, deacetylazy, metylotransferazy i demetylazy. Generalnie acetylacja histonów ułatwia dostęp aparatu transkrypcyjnego do nukleosomowego DNA i jest charakterystyczna dla aktywnej euchromatyny. Aktywacji transkrypcji sprzyja również metylacja i fosforylacja określonych reszt aminokwasowych histonów rdzeniowych H3 i H4. Deacetylacja histonów odpowiada za kondensację chromatyny i bierze udział w tworzeniu nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny [Berger, 2007].

Tab. 2. Modyfikacje potranslacyjne histonów [Berger, 2007]

Rodzaj modyfikacji potranslacyjnej histonu	Lokalizacja	Wpływ na transkrypcję
Acetylacja lizyny	H3 (9,14,15,86), H4 (5,8,13,16), H2A, H2B	Aktywacja
Fosforylacja seryny/treoniny	H3 (3,10,28), H2A, H2B	Aktywacja
Metylacja argininy	H3 (17,23), H4 (3)	Aktywacja
Metylacja lizyny	H4 (4,36,79) H3 (9,27), H4 (20)	Aktywacja Represja
Ubikwitynylacja lizyny	H2B (120) H2A (119)	Aktywacja Represja
Sumoilacja lizyny	H2B (6), H2A (126)	Represja

3.2.3. Związek pomiędzy metylacją DNA a modyfikacjami potranslacyjnymi histonów

Z danych literaturowych wynika, że metylacja DNA i modyfikacje histonów oddziałują ze sobą na różnych płaszczyznach, a złożone mechanizmy tych interakcji pozostają nadal niewyjaśnione. Nukleosomy zawierające niemetylowane DNA charakteryzują się wysokim stopniem acetylacji histonów rdzeniowych H3 i H4, co jest związane z otwartą strukturą chromatyny. Z drugiej zaś strony, nieaktywna heterochromatyna koreluje z wysokim poziomem metylacji dinukleotydów CpG i niską acetylacją histonów [Eden i wsp., 1998]. Do białek zaangażowanych w oddziaływanie pomiędzy metylacją DNA a modyfikacjami histonów zalicza się białka MECP2 (ang. *methyl-CpG binding protein 2*) i MBD2 (ang. *methyl-CpG binding domain protein 2*), które rekrutują deacetylazy histonowe do zmetylowanych regionów DNA [Jones i wsp., 1998]. Udowodniono również, że metylacja DNA sprzyja dimetylacji lizyny w pozycji 9 i hamuje metylację lizyny w pozycji 4 histonu H3, poprzez interakcje na poziomie enzymatycznym [Hashimshony i wsp., 2003]. Warto podkreślić, że interakcje te działają w obu kierunkach, to znaczy modyfikacje potranslacyjne histonów wpływają również na regionalny poziom metylacji DNA. Przykładowo, metylotransferazy histonów zawierające domenę SET, odpowiedzialne za trimetylację lizyny 9 histonu H3 i tworzenie heterochromatyny, rekrutują enzymy DNMT3A i DNMT3B do określonej lokalizacji w genomie, prowadząc do wyciszenia transkrypcyjnego genu [Fuks i wsp., 2003]. Obecnie uważa się, że współdziałanie pomiędzy metylacją DNA a modyfikacjami histonów jest procesem złożonym, odbywającym się na etapie interakcji enzymatycznych. Dodatkowo, w regulowanie aktywności transkrypcyjnej genów poprzez metylację DNA i modyfikacje potranslacyjne histonów zaangażowane są duże kompleksy białkowe, wiążące się z DNA w sąsiedztwie wyciszanych genów. Kompleksy te wpływają na ekspresję białka zarówno poprzez enzymatyczne, jak i strukturalne oddziaływania, prowadząc do zmiany lokalnej struktury chromatyny. Należą do nich między innymi białka z grupy Thrithorax i Polycomb [Cedar i Yehudit, 2009].

3.2.4. Niekodujący RNA

W regulacji ekspresji genów istotną rolę odgrywają cząsteczki RNA, należące do tzw. niekodujących RNA. Termin ten odnosi się do wszystkich transkryptów genu, które nie stanowią matrycy do syntezy białka [Mattick i Makunin, 2006]. Jednym z mechanizmów wyciszania ekspresji genów jest interferencja RNA, polegająca na przyłączeniu cząsteczki RNA o sekwencji komplementarnej do sekwencji mRNA wyłączanego genu. Wyciszanie genu może zachodzić przy udziale cząsteczek siRNA (ang. *small interfering RNA*) lub miRNA (ang. *microRNA*), które tworzą wraz z białkami kompleksy rybonukleoproteinowe RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Kompleksy miRISC (ang. *microRNA-induced silencing complex*) najczęściej łączą się z nieulegającym translacji końcem 3' transkryptu i hamują ekspresję genów poprzez złożone i nie do końca poznane mechanizmy, między innymi przez hamowanie tworzenia kompleksu rybosomalnego inicjującego translację i degradację mRNA za pomocą deadenylacji ogona poli(A) [Siedlecki, 2011].

3.3. Zaburzenia metylacji DNA w chorobach związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych

Analiza metylacji DNA, obok jej znaczenia w diagnostyce molekularnej zespołów chorobowych, stała się przedmiotem badań wielu projektów naukowych. W literaturze istnieje szereg prac, opisujących zaburzenia procesów metylacji DNA w chorobach neurodegeneracyjnych. Trudności w interpretacji ich wyników wynikają między innymi z zastosowania różnych technik biologii molekularnej. Należy również zaznaczyć, że zaburzenia wzorców metylacji DNA charakteryzuje specyficzność tkankowa. W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki prac, których celem była ocena stopnia metylacji wybranych fragmentów DNA, wyizolowanego z krwi obwodowej pacjentów z chorobami wynikającymi z mutacji dynamicznych.

3.3.1. Zespół łamliwego chromosomu X (FraX)

Wśród chorób związanych z ekspansją powtórzeń trójnukleotydomych najbardziej charakterystyczny profil zaburzeń metylacji DNA opisano w zespole łamliwego chromosomu X (FraX, ang. *fragile X syndrome*). FraX jest spowodowany mutacją o typie utraty funkcji w genie *FMRI*, zlokalizowanym w długich ramionach chromosomu X. U 99% populacji pacjentów wyciszenie genu *FMRI* jest spowodowane zwielokrotnieniem liczby powtórzeń trójnukleotydomych CGG ((CGG)_n>200) w regionie 5'UTR pierwszego eksonu *FMRI*, z następującą metylacją wysp CpG w sekwencjach promotorowych. Metylacja dinukleotydów CpG prowadzi do zahamowania syntezy produktu białkowego genu *FMRI*, który w warunkach fizjologicznych odpowiada za prawidłowy rozwój układu nerwowego w okresie płodowym [Pieretti i wsp., 1991]. W grupie pacjentów z łagodnym fenotypem choroby, u których pomimo pełnej ekspansji ((CGG)_n>200) nie występuje hipermetylacja wysp CpG, stwierdzono prawidłowy lub nawet podwyższony poziom transkryptu genu *FMRI* [Tassone i wsp., 2000]. Obserwacje te wskazują, że podstawową rolę w patogenezie FraX odgrywa nieprawidłowa metylacja DNA w regionie promotorowym genu *FMRI*.

Przy użyciu technik, opartych na sekwencjonowaniu DNA poddanego działaniu wodorosiarczynu sodu, określono prawidłowy wzór metylacji dinukleotydów CpG w promotorze i w sekwencjach proksymalnych do końca 5' promotora genu *FMRI*. Wykazano, że w warunkach fizjologicznych, w odległości około 650-800 nukleotydów w kierunku 5' od pierwszego eksonu genu *FMRI* znajduje się granica pomiędzy silnie zmetylowanymi a niezmetrylowanymi dinukleotydami CpG. U pacjentów z FraX granica ta jest utracona i metylacja DNA obejmuje zarówno sekwencje powyżej końca 5', jak i region promotorowy, włącznie z nieprawidłowymi powtórzeniami CGG. Autorzy pracy sugerują, że sekwencje znajdujące się w strefie przejściowej pomiędzy wysoce zmetylowanym a niezmetrylowanym fragmentem DNA pełnią funkcje regulatorowe i są miejscem wiązania się czynników transkrypcyjnych. Wskazują także, że ekspansja powtórzeń trójnukleotydu CGG w genie *FMRI* może zaburzać strukturę chromatyny w obrębie tych obszarów i prowadzić do hipermetylacji wysp CpG w kierunku 3' genu [Naumann i wsp., 2009].

3.3.2. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 2

Dane literaturowe wskazują na istnienie związku pomiędzy poziomem metylacji wysp CpG w regionie promotorowym genu *ATXN2* a przebiegiem klinicznym ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 2 (SCA2, ang. *spinocerebellar ataxia type 2*). Bauer i wsp. [2004] sugerują, że sekwencje DNA zawierające nieprawidłową liczbę powtórzeń trójnukleotydowych tworzą nieprawidłowe struktury drugorzędowe, które mogą aktywować proces metylacji *de novo* z udziałem metylotransferaz DNA. U pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 2 wykazano, że hipermetylacja dinukleotydów CpG w pobliżu miejsca startu transkrypcji w genie *ATXN2* jest związana z późniejszym początkiem pojawienia się objawów choroby i łagodniejszym przebiegiem klinicznym, w porównaniu do chorych z hipometylacją DNA w tym obszarze. Autorzy pracy wskazują, że zmienność w AOO u pacjentów z tą samą liczbą powtórzeń CAG może wynikać ze stopnia metylacji DNA w rejonie promotorowym genu i, co za tym idzie, z niższym poziomem ekspresji nieprawidłowego białka [Laffita-Mesa i wsp., 2012]. Należy jednak zaznaczyć, że w pracy określono stopień metylacji wybranych dinukleotydów CpG w stosunkowo małej grupie badanej, liczącej 23 chorych.

3.3.3. Ataksja Friedreicha

Związek pomiędzy metylacją DNA a ekspresją białka i fenotypem choroby wykazano u pacjentów z ataksją Friedreicha (FA, ang. *Friedreich ataxia*). Analizę metylacji DNA, wyizolowanego z krwi i błony śluzowej jamy ustnej, przeprowadzono przy użyciu techniki spektrometrii mas Mass-ARRAY EpiTYPER w grupie 85 pacjentów i 56 ochotników z grupy kontrolnej. U chorych stwierdzono nieprawidłowy wzór metylacji dinukleotydów CpG, zlokalizowanych w regionach flankujących sekwencję powtórzeń trójnukleotydu GAA w genie *FXN*. Region promotorowy genu *FXN* pozostawał niezmetylowany, zarówno w grupie badanej jak i w grupie kontrolnej. Dodatkowo korelację wykazano pomiędzy liczbą powtórzeń GAA w krótszym allelu *FXN* a poziomem metylacji DNA w kierunku 5' od nieprawidłowej sekwencji. Wykazano również, że hipermetylacja DNA w tym fragmencie wiąże się z niższym poziomem ekspresji białka frataksyny, wcześniejszym wiekiem pojawienia się objawów klinicznych i cięższym przebiegiem choroby [Evans-Galea i wsp., 2012]. Charak-

terystyczny wzór metylacji miejsc CpG w genie *FXN*, z hipermetylacją sekwencji w kierunku 5' i hipometylacją sekwencji w kierunku 3' od powtórzeń GAA, wykazano także w komórkach mózgu i mięśnia sercowego [Al-Mahdawi i wsp., 2008].

Mechanizmy prowadzące do zaburzeń epigenetycznych, przedstawione w wymienionych pracach, nie zostały ostatecznie poznane. Autorzy badań są jednak zgodni, że obserwowane zaburzenia metylacji DNA są najprawdopodobniej wynikiem obecności nieprawidłowych struktur w DNA lub RNA, które powstają na skutek zwiększonej liczby powtórzeń trójnukleotydomów. W chorobach związanych z obniżeniem ekspresji białka, takich jak FRAX, FA i dystrofia miotoniczna typu 1 udowodniono, że ekspansje powtórzeń trójnukleotydomów sprzyjają tworzeniu skondensowanej heterochromatyny i prowadzą do wyciszenia transkrypcyjnego genu [Bidichandani i wsp., 1998; Saveliev i wsp., 2003]. W badaniach na modelach komórkowych wykazano, że regiony okalające te sekwencje charakteryzuje nieprawidłowa struktura chromatyny, związana z hipoacetylacją i hipermetylacją histonów [Al-Mahdawi i wsp., 2008; Soragni i wsp., 2008]. Autorzy prac sugerują, że w chorobach ekspansji powtórzeń trójnukleotydomów, w sekwencjach sąsiadujących z mutacją dynamiczną występuje charakterystyczny, nieprawidłowy wzorzec metylacji DNA [López Castel i wsp., 2011; Evans-Galea i wsp., 2012]. Ze względu na różnice w molekularnym podłożu omawianych chorób, a także złożoność procesów epigenetycznych, określenie ich znaczenia w przebiegu klinicznym wymaga przeprowadzenia dalszych badań w tym obszarze.

3.4. Znaczenie wybranych modyfikacji epigenetycznych w patogenezie choroby Huntingtona

3.4.1. Zaburzenia modyfikacji potranslacyjnych histonów

Nieprawidłowe modyfikacje potranslacyjne, obejmujące hipoacetylację i hipermetylację histonów opisano w licznych badaniach dotyczących choroby Huntingtona, zarówno u pacjentów z HD, jak i na modelach mysich i liniach komórkowych. Jednym z białek o aktywności acetylotransferazy histonów jest czynnik transkrypcyjny CBP (ang. *CREB binding protein*). Białko CBP pełni funkcję aktywatora transkrypcji

poprzez acetylację histonów oraz interakcje z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi i białkami kompleksu preinicjacyjnego, wiążącego polimerazę RNA II [Bannister i Kouzarides, 1996]. Z badań literaturowych wynika, że zmutowana huntingtyna powoduje sekwestrację białka CBP przez bezpośrednie, toksyczne działanie powtórzeń poliglutaminowych. Zarówno w liniach komórkowych, jak i w mózgach pacjentów HD badanych *post mortem* wykazano, że obok huntingtyny, CBP jest składnikiem nieprawidłowych inkluzji wewnątrzkomórkowych [Nucifora i wsp., 2001]. Toksyczne działanie poliglutaminowych fragmentów HTT prowadzi do zahamowania zależnej od białka CBP acetylacji histonów i aktywacji transkrypcji. W konsekwencji dochodzi do hipoacetylacji i hipermetylacji białek histonowych oraz zaburzeń regulacji transkrypcji w neuronach [Sadri-Vakili i wsp., 2007].

Tworzeniu skondensowanej heterochromatyny w HD sprzyja trimetylacja lizyny w pozycji 9 histonu H3 (H3K9me3), wynikająca z nieprawidłowej aktywności metylotransferazy histonowej. Podwyższony poziom H3K9me3 jest proponowanym przez badaczy mechanizmem wyciszania ekspresji genów w HD, zarówno na poziomie pojedynczych genów jak i globalnym [Ryu i wsp., 2006; Stack i wsp., 2007]. Wykazano również, że hipermetylacja lizyny w pozycji 4 histonu 3 (H3K4me3), która w warunkach fizjologicznych związana jest z aktywacją polimerazy RNA II, jest zaburzona w neuronach prądkowia od pacjentów z HD [Bai i wsp., 2015]. Zmutowana huntingtyna wpływa na działanie różnych enzymów katalizujących reakcję metylacji histonów, takich jak HYPB (ang. *huntingtin interacting protein B*) oraz białek kompleksu PCR2 (ang. *polycomb repressive complex 2*) [Seong i wsp., 2010]. Pomimo, że zaburzenia kodu histonowego w HD zostały opisane w licznych pracach, ich znaczenie w przebiegu klinicznym choroby pozostaje nadal niewyjaśnione. Badania te przyczyniły się natomiast do podjęcia wielu prób terapeutycznych z zastosowaniem leków o działaniu epigenetycznym, w tym inhibitorów HDAC (ang. *histone deacetylases*) i inhibitorów metylotransferazy histonowej ESET (ang. *erg-associated protein with set domain*) [Lee i wsp., 2013].

3.4.2. Metylacja DNA w chorobie Huntingtona

Pierwsze doniesienia o znaczeniu metylacji DNA w chorobie Huntingtona dotyczyły imprintingu genomowego. Należy jednak podkreślić, że pochodzą one jeszcze sprzed 1993 roku, kiedy to odkryto molekularne podłoże HD. Imprinting genomowy, zwany również piętnowaniem rodzicielskim, polega na wybiórczym wyciszeniu jednego z alleli danego genu, w zależności od jego rodzicielskiego pochodzenia [Siedlecki, 2011]. Obserwowane w chorobie Huntingtona zjawisko antycypacji, zwłaszcza gdy zmutowany allel jest dziedziczony od ojca, próbowano wyjaśnić różnicami w poziomie metylacji pomiędzy allelem ojcowskim i matczynym [Erickson, 1985; Ridley, 1991]. W grupie pacjentów z HD wykazano odwrotną zależność pomiędzy wiekiem ich ojców w momencie narodzin dziecka, a początkiem objawów klinicznych choroby. Korelację tę stwierdzono zarówno, gdy zmutowany allel był dziedziczony od ojca, jak i od matki. Obserwacje te tłumaczono obniżaniem się poziomu metylacji DNA wraz z wiekiem, co powoduje, że starsi ojcowie przekazują gen o niższym stopniu metylacji cytozyn, w porównaniu do ojców młodszych [Farrer i wsp., 1992]. Dziś wiadomo, że za zjawisko antycypacji w HD odpowiada w głównej mierze niestabilność powtórzeń CAG podczas gametogenezy.

Pomimo, że według klasycznej definicji imprinting polega na całkowitym wyciszeniu jednego z alleli, z danych literaturowych wynika, że różnice w stopniu metylacji pomiędzy allelem ojcowskim i matczynym są zjawiskiem powszechnym i mogą dotyczyć nawet 35 000 miejsc w genomie [Luedi i wsp., 2007; Schalkwyk i wsp., 2010]. Metylacja specyficzna względem allelu (ang. *allele-specific methylation*) jest jednym z mechanizmów, który odpowiada za odmienną ekspresję allelu, w zależności od jego rodzicielskiego pochodzenia. Do innych mechanizmów zaliczyć można występowanie polimorfizmów w sekwencjach regulatorowych i w sekwencjach kodujących genów. Nie można zatem wykluczyć, że w chorobie Huntingtona istnieją różnice w ekspresji zmutowanej huntingtyny, zależne od rodzicielskiego pochodzenia nieprawidłowego allelu *HTT*.

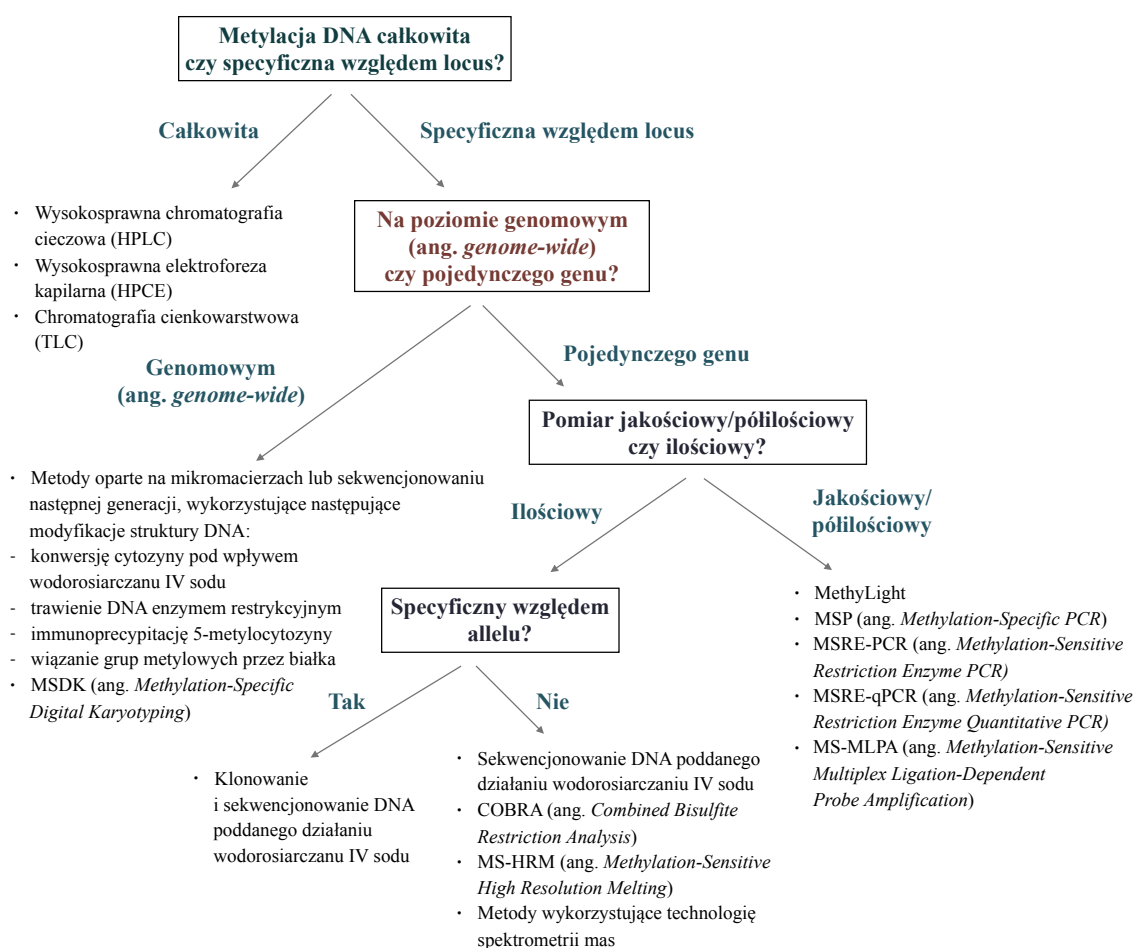
Poza imprintingiem genomowym opublikowano w literaturze niewiele prac, dotyczących metylacji DNA w chorobie Huntingtona. Na podstawie obserwowanych nieprawidłowości kodu histonowego i wzajemnych oddziaływań pomiędzy elementami

maszynie epigenetycznej można jednak podejrzewać, że u pacjentów z HD dochodzi również do zaburzeń metylacji DNA. W badaniach poziomu metylacji genów, których ekspresja jest obniżona w HD, takich jak BDNF (ang. *brain derived neurotrophic factor*) i ADORA2 (ang. *adenosine A_{2A} receptor*) nie wykazano istotnych różnic, pomiędzy liniami komórkowymi pochodzącymi od myszy transgenicznych z HD a komórkami prawidłowymi [Zajac i wsp., 2010; Villar-Menéndez i wsp., 2013]. Więcej informacji na temat metylacji DNA w chorobie Huntingtona dostarczyły analizy o zasięgu genomowym. W neuronach prądkowia i kory mózgowej myszy, syntetyzujących wydłużony trakt poliglutaminowy stwierdzono globalne obniżenie poziomu 5-hydroksymetylocytozyny, której obecność jest charakterystyczna dla genów aktywnych podczas rozwoju układu nerwowego [Wang i wsp., 2013]. W kolejnym badaniu, w neuronach prądkowia mózgu myszy transgenicznych, wykazano istotne zmiany w poziomie metylacji licznych dinukleotydów CpG. Zmiany te dotyczyły głównie dinukleotydów zlokalizowanych w sekwencjach międzygenowych. Za pomocą technik sekwencjonowania DNA poddanego działaniu wodorosiarczynu sodu oraz immunoprecypitacji 5-metylocytozyny naukowcy wykazali, że zaburzenia metylacji DNA są swoiste dla określonych genów i w zależności od lokalizacji mogą obejmować zarówno hipo- jak i hipermetylację CpG. Spośród zaobserwowanych zmian w modelach komórkowych HD przeważała hipometylacja regionów dystalnych genów i obszarów międzygenowych, obejmująca dinukleotydy CpG, które w warunkach fizjologicznych są częściowo zmetylowane. Wykazano również, że zmiany w poziomie metylacji genów *PAX6* i *NES*, zaangażowanych w procesy neurogenezy i różnicowania neuronów, powodują zaburzenia wiązania się czynników transkrypcyjnych oraz obniżoną ekspresję ich produktów białkowych [Ng i wsp., 2013]. Powyższe obserwacje sugerują, że ekspresja zmutowanej huntingtyny zaburza metylację DNA w komórkach nerwowych, jednak mechanizm tych zmian pozostaje nadal niewyjaśniony.

3.5. Metody badania metylacji DNA

Metylacja DNA jest modyfikacją stosunkowo stabilną, a jej ocenę można przeprowadzić zarówno w materiale z krwi, jak i z preparatów tkankowych. Techniki molekularne służące do badania stopnia metylacji DNA można podzielić na metody

służące do oceny całkowitej metylacji genomowego DNA oraz metody oceny metylacji pojedynczego genu. Uproszczony schemat wyboru odpowiedniej techniki, uzależniony od zakresu i celu planowanych badań, przedstawiono na ryc. 6. W ostatnich latach, po wprowadzeniu mikromacierzy DNA oraz sekwencjonowania następnej generacji, popularna stała się analiza tzw. metylomu, czyli mapy poziomu metylacji wysp CpG w genomie. W praktyce klinicznej molekularne metody oceny metylacji DNA znajdują zastosowanie w diagnostyce wrodzonych zaburzeń imprintingu genomowego. W ostatnich latach aktywnie poszukuje się również praktycznego zastosowania biomarkerów metylacyjnych w diagnostyce chorób nowotworowych.



Ryc. 6. Metody oceny metylacji DNA [zmodyfikowano na podstawie Shen i Waterland, 2007]

3.5.1. Ocena całkowitego poziomu metylacji DNA

Jedną z metod oceny całkowitej metylacji DNA jest określenie stosunku 5-metylocytozyny do cytozyny w badanej próbce. DNA jest poddawane działaniu enzymu metylospecyficznego lub bakteryjnej metylotransferazy, po czym następnie rozdziel i znakowanie uzyskanych produktów. Wykorzystywane są takie techniki jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), wysokosprawna elektroforeza kapilarna (HPCE) i chromatografia cienkowarstwowa (TLC) [Majchrzak i Baer-Dubowska, 2009]. Metody analizy całkowitego poziomu metylacji DNA nie pozwalają na lokalizację wykrytych nieprawidłowości w genomie, stąd możliwości określenia znaczenia funkcjonalnego tych zmian są ograniczone.

3.5.2. Analiza stopnia metylacji dinukleotydów CpG pojedynczego genu

Wyróżnia się cztery główne strategie, służące do oceny metylacji DNA: trawienie DNA przez enzymy restrykcyjne wrażliwe i niewrażliwe na metylację cytozyny, konwersję DNA wodorosiarczynem sodu, immunoprecypitację cytozyny oraz wykorzystanie białek z domeną wiążącą grupę metylową [Zilberman i Henikoff, 2007, ryc. 7]. W ostatnich latach wprowadzono wiele nowoczesnych metod opartych na powyższych strategiach, co pozwala na precyzyjne ustalenie wzoru metylacji wysp CpG zarówno na poziomie pojedynczego genu jak i w skali genomowej.

3.5.2.1. Metody wykorzystujące trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Metylospecyficzne enzymy restrykcyjne (MSRE, ang. *Methylation-Sensitive Restriction Enzymes*) rozpoznają określoną sekwencję DNA i w zależności od rodzaju enzymu mogą hydrolizować sekwencję zmetylowaną lub niezmetrylowaną. Do najczęściej stosowanych enzymów z grupy MSRE należą izoschizomery *HpaII* i *MspI*. Enzym *HpaII* hydrolizuje sekwencję 5'-CCGG-3' w przypadku gdy cytozyna w dinukleotydzie CpG jest niezmetrylowana, natomiast *MspI* trawi tę sekwencję bez względu na metylację cytozyny [Bird i Southern, 1978]. Produkty trawienia można poddać amplifikacji PCR (ang. *polymerase chain reaction*) z zastosowaniem odpowiednich starterów, a następnie rozdzielowi elektroforetycznemu na żelu agarozowym (MSRE-PCR) lub amplifikacji w reakcji ilościowego PCR (MSRE-qPCR). Hydroliza sekwencji niezmetrylowanych

pod wpływem działania *HpaII* uniemożliwia ich powielenie w reakcji PCR, natomiast sekwencje zmetylowane ulegną amplifikacji. Różnice w rozdziale elektroforetycznym produktów w MSRE-PCR lub w wartości progowej Ct w MSRE-qPCR są miarą poziomu metylacji cytozyny w badanej sekwencji. Należy podkreślić, że metody oparte na trawieniu DNA enzymem restrykcyjnym nie umożliwiają zbadania każdej wybranej sekwencji, a jedynie fragmentów DNA, w obrębie których występują miejsca trawienia przez restryktazy. W ostatnich latach coraz większą popularność zyskuje w diagnostyce wrodzonych zaburzeń imprintingu technika MS-MLPA (metylo-specyficzna amplifikacja multiplex zależna od ligacji sond molekularnych), która również w swoim protokole wykorzystuje trawienie DNA enzymem metylospecyficznym. W zależności od zastosowanego zestawu sond pozwala ona na półilościową analizę metylacji DNA nawet w 50 sekwencjach w genomie [Majchrzak i Baer-Dubowska, 2009].

3.5.2.2. Chemiczna modyfikacja cytozyny przez wodorosiarczyn sodu

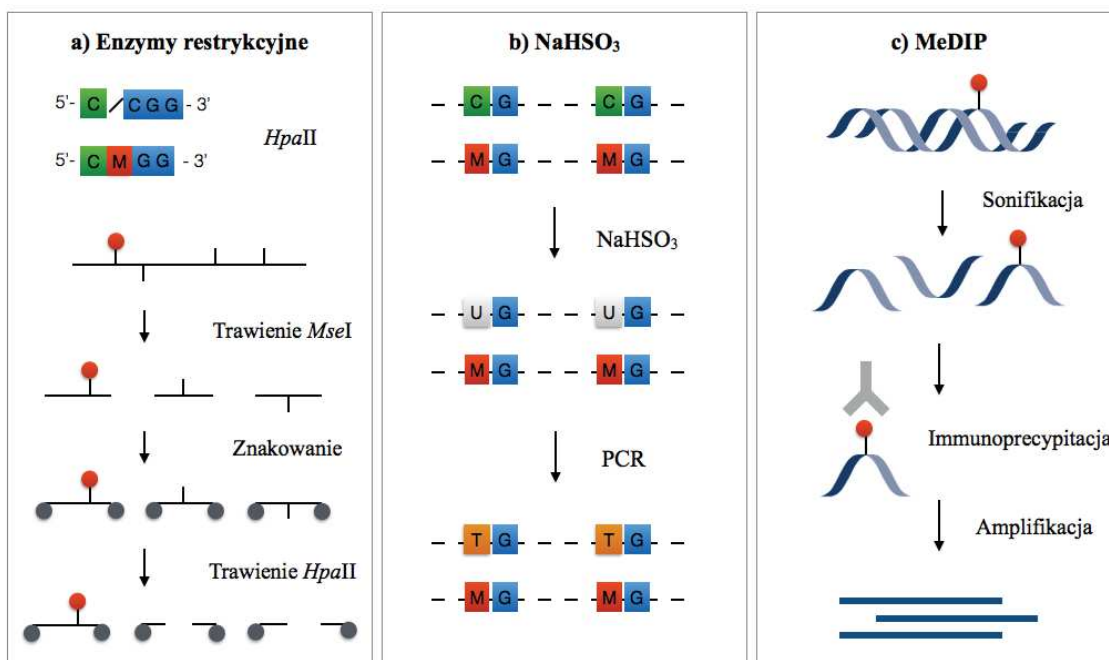
Większość obecnie stosowanych technik analizy metylacji DNA opartych jest na chemicznej modyfikacji DNA przez wodorosiarczyn sodu. Pod wpływem tego związku niezmetrylowana cytozyna ulega konwersji do uracylu, natomiast 5-metylocytozyna pozostaje niezmienną. Po konwersji przeprowadzana jest reakcja PCR i analiza sekwencji produktów [Clark i wsp., 1994]. Do czułych i szybkich metod detekcji metylacji DNA, na poziomie pojedynczego genu, należy metylo-specyficzny PCR (MSP, ang. *methylation sensitive PCR*), a także techniki wykorzystujące reakcję PCR w czasie rzeczywistym (MethyLight). Zostały one opracowane do analizy całkowicie zmetylowanych lub niezmetrylowanych alleli i nie umożliwiają dokładnej oceny częściowej metylacji w danym locus [Shen i Waterland, 2007]. Metody ilościowej oceny poziomu metylacji DNA obejmują między innymi pirosekwencjonowanie DNA, poddanego uprzednio reakcji konwersji z udziałem wodorosiarczynu sodu oraz techniki wykorzystujące spektrometrię mas [Zilberman i Henikoff, 2007]. Pirosekwencjonowanie umożliwia określenie procentowego poziomu metylacji DNA w wybranej pozycji nukleotydowej poprzez zbadanie stosunku cytozyn do tymin. Jest metodą wydajną i czułą w odniesieniu do ilościowej oceny poziomu metylacji DNA pod warunkiem prawidłowo przeprowadzonej konwersji [Tost i Gut, 2007]. Ograniczeniem metody jest

możliwość zsekwencjonowania jedynie 25-30 par zasad w jednej reakcji oraz potrzeba posiadania specjalistycznego sprzętu do przeprowadzenia reakcji. Dodatkowo, w przypadku wszystkich metod opartych na konwersji DNA wodorosiarczynem sodu istnieje ryzyko znacznej degradacji próbki podczas procedury konwersji. W wyniku zmiany sekwencji nukleotydowej problematyczne może być również zaprojektowanie odpowiednich starterów do reakcji PCR.

3.5.3. Analiza metylacji DNA w skali genomowej

Wśród metod umożliwiających ocenę genomowych profili metylacji DNA dużą popularnością cieszą się techniki mikromacierzowe. W zależności od rodzaju mikromacierzy, analizowany DNA jest przed hybrydyzacją poddawany konwersji przez wodorosiarczyn sodu, trawiony przez enzymy metylospecyficzne lub immunoprecypitowany z użyciem przeciwciała, wiążącego zmetylowaną cetozynę. Uzyskany materiał, po wyznakowaniu barwnikiem fluorescencyjnym hybryduje do umieszczonych na płycie sond, a otrzymany sygnał podlega opracowaniu przy pomocy specjalistycznych programów bioinformatycznych.

W ostatnich latach wprowadzono także metody badania metylacji DNA, wykorzystujące sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*). Techniki te oparte są na sekwencjonowaniu DNA, poddanego działaniu wodorosiarczynu sodu, pod wpływem którego niezmetylowana cytozyna ulega konwersji do uracylu. Możliwe jest zastosowanie paneli celowanych, takich jak Methyl-Seq, określających stopień metylacji DNA w wybranych sekwencjach genomu o udowodnionym wpływie metylacji na regulację ekspresji genu. W celu określenia poziomu metylacji DNA w obrębie całego genomu możliwe jest przeprowadzenie analizy WGBS (ang. *Whole-genome bisulfite sequencing*) [Yong i wsp., 2016].



Ryc. 7. Metody oceny metylacji dinukleotydów CpG pojedynczego genu. **a)** trawienie DNA przez metylospecyficzne enzymy restrykcyjne, **b)** chemiczna modyfikacja cytozyny przez wodorosiarczyn sodu (NaHSO₃), **c)** immunoprecypitacja metylocytozyny (ang. methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP) [Schones i Zhao, 2008]. Opis metod przedstawiono w tekście

4. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Choroba Huntingtona jest genetycznie uwarunkowaną chorobą zwyrodnieniową ośrodkowego układu nerwowego, o początku objawów klinicznych najczęściej w 4-5 dekadzie życia. Pomimo, że liczba powtórzeń CAG silnie koreluje z czasem wystąpienia objawów choroby, obserwuje się istotne różnice pomiędzy wiekiem zachorowania u osób z tą samą liczbą powtórzeń, nawet w obrębie jednej rodziny. Sugeruje to udział innych czynników modyfikujących w rozwoju HD.

W ostatnich latach podkreśla się rolę zaburzeń epigenetycznych w patogenezie i przebiegu schorzeń neurodegeneracyjnych. Z uwagi na potencjalną odwracalność modyfikacji epigenetycznych aktywnie poszukuje się wśród nich markerów, które mogłyby posłużyć jako cele terapii opóźniającej wystąpienie objawów i spowolnienie progresji choroby. W literaturze znajduje się niewiele doniesień, dotyczących zaburzeń metylacji DNA w chorobie Huntingtona. Istniejące dane sugerują, że ekspresja zmutowanej huntingtyny zaburza regulację metylacji DNA w komórkach nerwowych. Jak dotąd nie zbadano, czy poziom metylacji DNA w genie *HTT* koreluje z wiekiem zachorowania lub z innymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. Określenie, czy w chorobie Huntingtona dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA genu *HTT* jest kluczowe w perspektywie poszukiwania terapii epigenetycznych w HD.

Dlatego też celem badań podjętych w niniejszej pracy doktorskiej było:

- Określenie wpływu wybranych czynników na wiek zachorowania (AOO) w grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona. Czynniki te obejmowały: liczbę powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT*, rodzicielskie pochodzenie zmutowanego allela, występowanie choroby u rodzica oraz wiek zachorowania rodzica.
- Zbadanie, czy u chorych z HD dochodzi do nieprawidłowej metylacji genu *HTT*, w DNA pochodzącym z komórek krwi obwodowej.
- Określenie związku pomiędzy wynikami analizy metylacji genu *HTT* a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby.

5. MATERIAŁY I METODY

Na przeprowadzenie badań, zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej otrzymano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym- pismo nr NKEBN/254/2011, NKBBN/254-431/2012 oraz NKBBN/254-113/2013.

5.1. Analiza wpływu wybranych czynników klinicznych i molekularnych na wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*)

5.1.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły dane, dotyczące 452 objawowych pacjentów z chorobą Huntingtona, u których określono wiek zachorowania oraz liczbę powtórzeń CAG w zmutowanym allelu genu *HTT*. Dane te otrzymano z pięciu ośrodków w Polsce, należących do Europejskiej Sieci Choroby Huntingtona (EHDN) tzn.: Poradni Schorzeń Układu Pozapiramidowego Szpitala Św. Wojciecha w Gdańsku (kierownik: prof. dr hab. n. med. Jarosław Sławek), Katedry Medycyny Społecznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik ośrodka badawczego: dr n. med. Daniel Zielonka), Centrum Neurologii Klinicznej Krakowskiej Akademii Neurologii (kierownik ośrodka badawczego: prof. dr hab. n. med. Andrzej Szczudlik), Katedry i Kliniki Neurologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (kierownik: dr hab. n. med. Monika Rudzińska) oraz Katedry i Kliniki Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik ośrodka badawczego: dr hab. n. med. Piotr Janik). W badaniu analizowano następujące zmienne:

- wiek chorego,
- płeć,
- wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*),
- liczbę powtórzeń CAG w nieprawidłowym allelu *HTT* ((CAG)_n),
- płeć rodzica, u którego stwierdzono HD,
- wiek zachorowania rodzica.

5.1.1.1. Przeprowadzone analizy oraz charakterystyka badanych grup

W ramach poszukiwania wpływu czynników modyfikujących, w tym metylacji DNA, na przebieg kliniczny choroby Huntingtona przeprowadzono analizy statystyczne, które miały na celu określenie zależności wieku zachorowania pacjenta (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) oraz dodatkowo, od następujących czynników:

- płci rodzica, od którego pacjent odziedziczył zmutowany allel (w grupie 375 chorych),
- występowania choroby u rodzica, bez względu na jego płeć (w grupie 428 chorych),
- wieku zachorowania rodzica (w grupie 329 chorych).

W podgrupach chorych, wyodrębnionych na podstawie rodzicielskiego pochodzenia zmutowanego allela oraz występowania choroby u rodzica przeprowadzono analizę różnic między średnimi wartościami zmiennych AOO i (CAG)_n.

Z danych literaturowych wynika, że wpływ liczby powtórzeń CAG na przebieg kliniczny HD jest słabiej wyrażony wśród pacjentów z krótszymi allelami [Gusella i MacDonald, 2009]. Dlatego też, aby określić czy wyżej wymienione czynniki mają wpływ na wiek zachorowania w HD, analizy statystyczne przeprowadzono również w grupie chorych z liczbą powtórzeń CAG ≤ 50. W badaniach, których celem jest poszukiwanie czynników modyfikujących przebieg chorób poliglutaminowych często przeprowadza się dodatkowe analizy w podgrupie chorych z krótszymi allelami [Genetic Modifiers of Huntington's Disease Consortium, 2015; Figueroa i wsp., 2017]. Charakterystykę pacjentów przedstawiono w Tab. 3-5.

Tab. 3. Charakterystyka grupy 452 pacjentów z HD pod względem wywiadu rodzinnego

	Ogółem	Kobiety	Mężczyźni
¹ Wszyscy objawowi pacjenci z HD	452	241	211
² Pacjenci z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku HD	375	203	172
HD u matki	181	102	79
HD u ojca	194	101	93
Znany wiek zachorowania rodzica	329	181	148
Znany wiek zachorowania matki	161	91	70
Znany wiek zachorowania ojca	168	90	78

¹ dotyczy nosicieli mutacji z liczbą powtórzeń CAG ≥ 36 , u których badacze EHDN określili wiek zachorowania

² spośród pozostałych pacjentów 53 zgłosiło, że żaden z rodziców i dalszych krewnych nie chorował na HD, zaś w przypadku 24 wywiad rodzinny był nieznyany

Tab. 4. Charakterystyka grupy 452 pacjentów z HD pod względem wybranych parametrów. Wiek i AOO podano w latach

Płeć		Kobiety	Mężczyźni
Wiek	Średnia	51,42	51,43
	SD	13,93	13,7
	Min	11	11
	Max	87	82
Wiek zachorowania (AOO)	Średnia	41,2	40,47
	SD	13,18	13,33
	Min	6	4
	Max	78	72
(CAG) _n	Średnia	45,09	45,08
	SD	7,07	7,66
	Min	36	37
	Max	90	108

(CAG)_n – liczba CAG w zmutowanym allelu *HTT*; SD – odchylenie standardowe; Min – wartość minimalna; Max – wartość maksymalna

Tab. 5. Wywiad rodzinny w kierunku HD w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$

	Ogółem	Kobiety	Mężczyźni
Pacjenci z $(CAG)_n \leq 50$	389	205	184
¹ Pacjenci z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku HD	318	170	148
HD u matki	156	89	67
HD u ojca	162	81	81
Znany wiek zachorowania rodzica	280	151	129
Znany wiek zachorowania matki	139	79	60
Znany wiek zachorowania ojca	141	72	69

¹ spośród pozostałych pacjentów 50 zgłosiło, że żaden z rodziców i dalszych krewnych nie chorował na HD, zaś w przypadku 21 wywiad rodzinny był nieznan

5.1.2. Metody statystyczne

Wszystkie analizy statystyczne w niniejszej pracy doktorskiej zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Romanem Ardanem z Zakładu Ekonometrii Wydziału Nauk Ekonomicznych Politechniki Koszalińskiej. Obliczenia statystyczne wykonano w programie STATISTICA 10 (StatSoft, USA).

- Ze względu na to, że rozkłady wieku zachorowania (AOO) spełniały założenie rozkładu normalnego, do oceny różnic między średnimi wartościami analizowanej zmiennej w grupie chorych, którzy odziedziczyli mutację od matki i w grupie chorych, którzy odziedziczyli mutację od ojca zastosowano parametryczny test T-Studenta. Do oceny różnic między średnimi wartościami liczby powtórzeń CAG w obu tych grupach zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya. Testem Kołmogorowa-Smirnowa odrzucono bowiem hipotezę o rozkładzie normalnym zmiennej $(CAG)_n$.
- Ze względu na dużą różnicę w liczebności badanych prób do oceny różnic między średnimi wartościami zmiennych AOO i $(CAG)_n$ w grupie chorych, u których stwierdzono HD u jednego z rodziców oraz w grupie chorych z nieobciążonym wywiadem rodzinnym zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya.

- Analizę statystyczną zależności AOO od $(CAG)_n$ oraz innych czynników przeprowadzono za pomocą jedno- i wieloczynnikowych modeli regresji liniowej. Zmienne AOO i $(CAG)_n$ zostały uprzednio zlogarytmizowane. Liniowa zależność pomiędzy logarytmami tych zmiennych odpowiada potęgowemu modelowi regresji pomiędzy zmiennymi niezlogarytmizowanymi. Model ten wykazał się najlepszym dopasowaniem, mierzonym współczynnikiem determinacji R^2 , w grupie wszystkich objawowych chorych ($n=452$) (Rozdział Wyniki, str. 68). Jest on również najczęściej opisywany w literaturze [Langbehn i wsp., 2010]. Dwa dodatkowe czynniki, tj. występowanie choroby u rodzica oraz płeć chorego rodzica, zostały zmodelowane zmienną binarną (zerojedynekową), natomiast wiek zachorowania rodzica zastosowano w postaci zlogarytmizowanej.

Do porównania modeli zagnieżdżonych wykorzystano wartości skorygowanego współczynnika R^2 . W przypadku, gdy dodanie zmiennej do modelu zwiększa wartość skorygowanego R^2 , wtedy tę zmienną powinno się brać pod uwagę. Należy podkreślić, że rozkłady reszt w analizowanych modelach, a także rozpatrywanych zmiennych przed i po zlogarytmizowaniu, nie spełniały założeń rozkładu normalnego. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę dużą liczbę badanych chorych, wnioskowanie o istotności czynników, oparte o t-statystykę nie jest obciążone znaczącym błędem [Faraway, 2002]. Łatwość interpretacji wyników była dodatkowym argumentem na rzecz wykorzystania analizy regresyjnej.

5.2. Badanie metylacji genu *HTT* metodą trawienia DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (MSRE-qPCR)

5.2.1. Materiał

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, pochodząca od 151 objawowych pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 117 zdrowych ochotników. Próbkę krwi pacjentów otrzymano z pięciu ośrodków EHDN w Polsce, wymienionych w rozdziale 5.1.1. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe, których krew pobrano na terenie

Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego (UCK) w Gdańsku. Do grupy tej włączono również pacjentów Poradni Genetycznej UCK z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku HD, u których badanie molekularne wykluczyło obecność mutacji w genie *HTT*. Pacjenci Poradni Genetycznej UCK, u których wykryto patogenną mutację byli w pierwszej kolejności kierowani do Poradni Schorzeń Układu Pozapiramidowego Szpitala Św. Wojciecha w Gdańsku, celem dokładnej oceny klinicznej według skal EHDN. Wszystkie osoby włączone do badania, po zapoznaniu się z jego projektem, wyraziły świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu.

5.2.1.1. Kryteria włączenia i wyłączenia do badania

A. Grupa badana:

Kryteria włączenia:

- pacjent lub jego opiekunowie prawni wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu,
- u pacjenta rozpoznano chorobę Huntingtona na podstawie badania molekularnego liczby powtórzeń CAG w genie *HTT*,
- u pacjenta badacze EHDN określili wiek zachorowania,
- u pacjenta nie stwierdzono ogniskowego uszkodzenia mózgu (przebytych ciężkich oraz umiarkowanie ciężkich urazów głowy, udarów, zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych).

Kryteria wyłączenia:

- przetoczenie preparatu krwiopochodnego w przeciągu 6 miesięcy poprzedzających badanie

B. Grupa kontrolna:

Kryteria włączenia:

- osoba powyżej 18 r.ż., która wyraziła świadomą zgodę na udział w badaniu,
- wywiad rodzinny nieobciążony w kierunku chorób neurodegeneracyjnych lub psychicznych u krewnych I i II stopnia,
- w przypadku osób, pochodzących z rodzin obciążonych chorobą Huntingtona wykluczenie nosicielstwa mutacji na podstawie badania molekularnego.

Kryteria wyłączenia (wystarczy jedno z poniższych):

- przewlekłe choroby serca, nerek, wątroby, zaburzenia neurologiczne lub choroby tkanki łącznej,
- choroba nowotworowa,
- przetoczenie preparatu krwiopochodnego w przebiegu 6 miesięcy poprzedzających badanie.

5.2.1.2. Charakterystyka grupy badanej

Pacjenci włączeni do badania podlegali ocenie klinicznej przez zespół specjalistów w dziedzinie neurologii i psychologii klinicznej w ramach wielośrodkowego projektu REGISTRY EHDN. W projekcie tym chorym i członkom ich rodzin z grupy ryzyka zlecano również badanie molekularne w kierunku mutacji w genie *HTT*, wykonane w Zakładzie Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (dr n. med. Wioletta Krysa, kierownik: prof. dr hab. n. med. Jacek Zaremba). W grupie objawowych nosicieli mutacji wiek zachorowania określono na podstawie wytycznych obowiązujących w REGISTRY, z uwzględnieniem wywiadu zebranego od chorego i członków jego rodziny lub opiekunów oraz szczegółowego badania według skal EHDN. W niniejszym badaniu analizowano następujące zmienne:

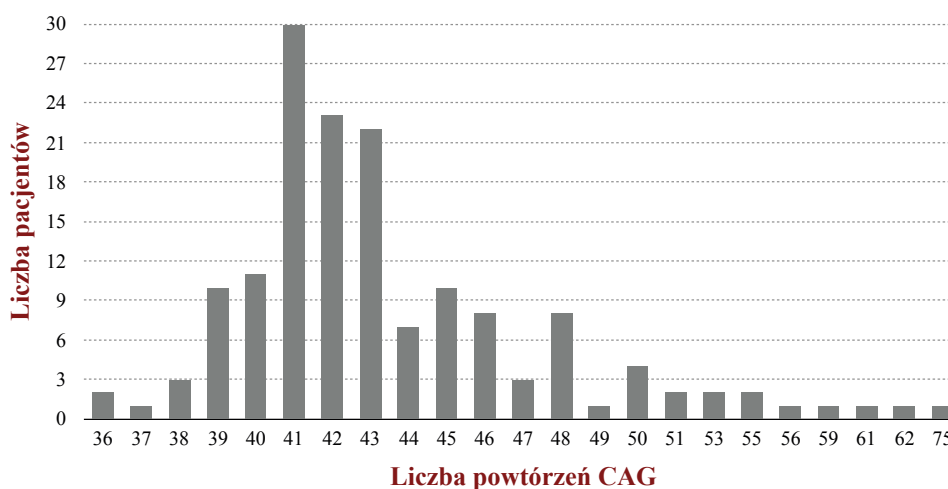
- wiek chorego,
- płeć,
- wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*),
- czas trwania choroby, wyrażony jako różnica między wiekiem chorego a AOO,
- liczbę powtórzeń CAG w nieprawidłowym allelu *HTT* ((CAG)_n),
- liczbę punktów w trzech domenach skali UHDRS: skali ruchowej TMS (ang. *Total Motor Score*), skali ogólnej sprawności funkcjonalnej TFC (ang. *Total Functional Capacity*) oraz w Skali Funkcjonowania (SF), określoną w dniu pobrania krwi od chorego.

Charakterystykę populacji pod względem wyżej wymienionych zmiennych przedstawiono w tab. 6 oraz na ryc. 8.

Tab. 6. Charakterystyka pacjentów, u których przeprowadzono badanie metodą MSRE-qPCR, pod względem analizowanych zmiennych

Zmienna	Kobiety (n=94)				Mężczyźni (n=57)			
	Średnia	SD	Min	Max	Średnia	SD	Min	Max
Wiek	49,67	12,63	16	75	52,82	11,97	25	78
AOO	41,69	11,92	8	67	43,77	11,86	17	64
CTCh	7,97	5,41	1	33	9,05	5,39	1	28
(CAG) _n	44,12	5,63	36	75	43,24	3,78	38	56
TMS	49,09	25,48	4	102	49,55	18,22	16	90
TFC	7,81	3,72	1	13	7,80	2,93	2	13
SF	16,82	6,73	1	25	17,73	4,78	7	25

SD – odchylenie standardowe; **Min** – wartość minimalna; **Max** – wartość maksymalna; **AOO** (ang. *age of onset*) – wiek zachorowania; **CTCh** – czas trwania choroby; **(CAG)_n** – liczba powtórzeń CAG w nieprawidłowym allele *HTT*; **TMS** (ang. *Total Motor Score*) – skala zaburzeń ruchowych, zakres 0-124 pkt., liczba pkt. wzrasta wraz z nasileniem objawów ruchowych; **TFC** (ang. *Total Functional Capacity*) – skala ogólnej sprawności funkcjonalnej, zakres 0-13 pkt., liczba pkt. maleje wraz ze stopniem nasilenia choroby; **SF** – Skala Funkcjonowania, zakres 0-25 pkt., liczba pkt. maleje wraz ze stopniem nasilenia choroby.



Ryc. 8. Liczebność grupy badanej w zależności od liczby powtórzeń CAG w genie *HTT*

5.2.1.3. Charakterystyka grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 117 zdrowych ochotników, odpowiadających wiekiem oraz płcią grupie badanej. Charakterystykę grupy kontrolnej, pod względem wybranych parametrów, przedstawiono w tab. 7.

Tab. 7. Charakterystyka grupy kontrolnej

Płeć	Liczba osób	Wiek (lata)			
		Średnia	SD	Min	Max
Kobiety	71	45,23	13,42	24	93
Mężczyźni	46	47,82	14,16	22	71

SD – odchylenie standardowe; Min – wartość minimalna; Max – wartość maksymalna

5.2.2. Metody

5.2.2.1. Izolacja genomowego DNA

DNA wyizolowano z 2 ml pełnej krwi obwodowej metodą ekstrakcji na kolumnkach, przy użyciu zestawu *Qiagen DNA Blood Midi Kit* (Qiagen, Niemcy). Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Stężenie oraz jakość wyizolowanego DNA określano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies Inc., USA). Wszystkie próbki DNA spełniały parametry jakości $A_{260}/A_{280} > 1,8$ oraz $A_{260}/A_{230} > 1,9$.

5.2.2.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Do trawienia DNA zastosowano zestawy EpiJET DNA Methylation Analysis Kit: *MspI/HpaII* oraz *TaqI/HpyF30I* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Enzymy *MspI* i *HpaII* są izoschizomerami rozpoznającymi sekwencję nukleotydową 5'-CCGG-3'. Enzym *HpaII* hydrolizuje sekwencję 5'-CCGG-3' w przypadku gdy cytozyna w dinukleotydzie CpG jest niezmetylowana, natomiast *MspI* trawi tę sekwencję bez względu na jej stopień metylacji. Izoschizomery *TaqI* i *HpyF30I* rozpoznają sekwencję DNA 5'-TCGA-3'. Metylacja cytozyny w tetranukleotydzie 5'-TCGA-3' hamuje trawienie przez *HpyF30I*, natomiast nie ma wpływu na działanie enzymu *TaqI*. Doświadczenie zostało wykonane zgodnie z poniższą procedurą:

- a) W celu kontroli efektywności trawienia przeprowadzono reakcję kontrolną z dostarczonymi próbkami zmetylowanego i niezmetylowanego DNA wektora plazmidowego pUC19/SmaI. Reakcję przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

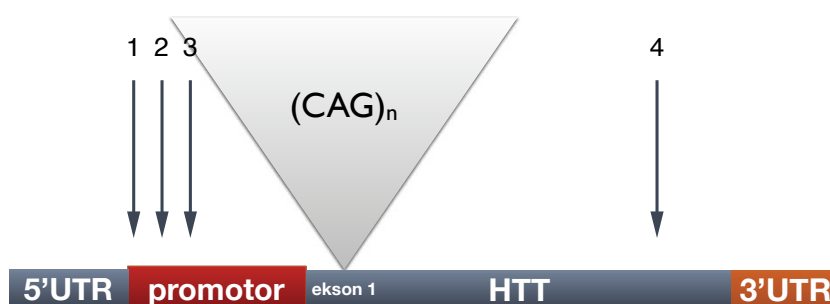
- b) Dla każdej z próbek genomowego DNA przygotowano trzy mieszaniny reakcyjne: jedną zawierającą enzym *HpaII* (próbka badana), drugą zawierającą enzym *MspI* (kontrola negatywna) oraz trzecią, zawierającą 50% glicerol (kontrola pozytywna, DNA nietrawiony). Początkowo, zgodnie z protokołem producenta stosowano nietrawiony DNA, jako referencyjny w ilościowej reakcji PCR, co wiązało się z otrzymywaniem istotnie zawyżonych wyników poziomu metylacji CpG. Na podstawie obserwacji własnych zmodyfikowano protokół badania i jako DNA referencyjny w qPCR zastosowano DNA matrycowy trawiony enzymem *HpyF30I*. Dokładny opis modyfikacji protokołu opisano w rozdziale Wyniki (str. 76-80). W tab. 8. przedstawiono składy mieszanin reakcyjnych.
- c) Probówki inkubowano w termocyklerze w temp. 37°C przez 60 min, a następnie w temp. 90°C przez 10 min.
- d) Do reakcji qPCR próbówki rozcieńczono 15x wodą podwójnie destylowaną (ddH₂O).

Tab. 8. Składy mieszanin reakcyjnych w reakcjach trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Składnik mieszaniny reakcyjnej	DNA nietrawiony	DNA trawiony <i>HpaII</i>	DNA trawiony <i>MspI</i>	DNA trawiony <i>HpyF30I</i>
	1	2	3	4
DNA	0.8 µg	0.8 µg	0.8 µg	0.8 µg
10X EpiBuffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
50% glicerol	1 µl	-	-	-
<i>HpaII</i>	-	1 µl	-	-
<i>MspI</i>	-	-	1 µl	-
<i>HpyF30I</i>	-	-	-	1 µl
ddH ₂ O	do 20 µl	do 20 µl	do 20 µl	do 20 µl
Całkowita objętość	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

5.2.2.3. Projektowanie starterów do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy

Startery do reakcji qPCR zaprojektowano na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji DNA genu *HTT*. Do badania poziomu metylacji DNA wybrano cztery fragmenty genu *HTT*: trzy zlokalizowane w regionie promotorowym oraz jeden w sekwencji kodującej genu (ang. *gene body*) (ryc. 9). Startery zostały zaprojektowane tak, aby w obrębie każdego z badanych amplikonów znajdowała się tylko jedna sekwencja 5'-CCGG-3', rozpoznawana przez enzymy *HpaII* i *MspI*. Należy również podkreślić, że żaden z amplikonów nie zawierał tetranukleotydu 5'-TCGA-3', hydrolizowanego przez enzymy *HpyF30I* i *TaqI*. Sekwencje starterów użytych do analizy MSRE-qPCR dla poszczególnych fragmentów genu *HTT* przedstawiono w tab. 9.



Ryc. 9. Lokalizacja starterów w obrębie genu *HTT*. UTR – ang. *untranslated region*

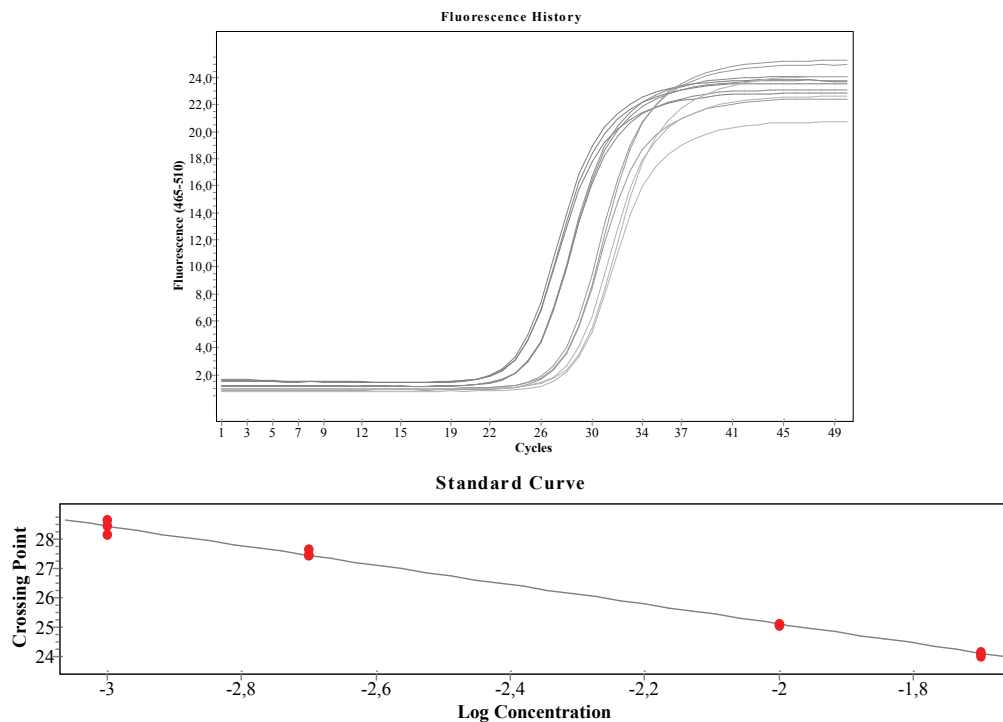
Tab. 9. Sekwencje starterów użytych do analizy MSRE-qPCR dla poszczególnych fragmentów genu *HTT*

Numer	Region genu <i>HTT</i>	Lokalizacja względem wyspy CpG*	Startery	Sekwencja (5'-3')
1	Promotor	brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shore</i>)*	F	CTGGCTAAAGTAGGCTTTACTG
			R	GGAGTAAGGTTGGCCTCA
2	Promotor	brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shore</i>)*	F	CTGAGCTGCTGCTGAAT
			R	GGGCGTTTCTTTATGGGAG
3	Promotor	wyspa CpG	F	CGGGTGAGTATGGCTCT
			R	CATGCGGAAAGGATCCC
4	Sekwencja kodująca (ang. <i>gene body</i>)	-	F	GGGAAGGTCTCTGTAGGC
			R	CTCCAGCATGTCCCAAAT

*wg bazy UCSC Genome Browser; **F** – starter (ang.) *forward*, **R** – starter (ang.) *revers*

5.2.2.4. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*) wykorzystano próbki, będące produktami trawienia enzymami *HpaII* (DNA badany) oraz *HpyF30I* (DNA referencyjny, kontrola pozytywna). Wydajność reakcji dla każdego startera wyznaczono na podstawie krzywej standardowej z serii rozcieńczeń matrycy (ryc. 10). Amplifikację przeprowadzano w objętości 10 μ l na płytkach 96-dołkowych, w trzykrotnych powtórzeniach, przy użyciu aparatu LightCycler® 480-II firmy Roche. Każdorazowo stosowano również kontrolę negatywną, która zawierała wszystkie substraty do reakcji qPCR za wyjątkiem matrycowego DNA. Temperaturę przyłączania starterów ustalono empirycznie. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki doświadczenia przedstawiono w tab. 10 i 11. Wyniki badania qPCR analizowano za pomocą oprogramowania LightCycler 480, wersja 1.5 (Roche). Po każdej reakcji przeprowadzano analizę krzywej topnienia, w celu sprawdzenia jakości otrzymanych produktów. Wydajność reakcji dla każdego układu PCR mieściła się w granicach 1.9-2.1.



Ryc. 10. Krzywa standardowa dla reakcji amplifikacji regionu 4 genu *HTT*, wyznaczona na podstawie serii rozcieńczeń matrycy; wydajność reakcji: 1,998

Tab. 10. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji qPCR

Odczynnik	Objętość w jednej próbce
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)	5 µl
Starter F	0.5 µl
Starter R	0.5 µl
dd H ₂ O	2 µl
DNA matrycowy	2 µl
Całkowita objętość	10 µl

Tab. 11. Profil termiczny reakcji qPCR

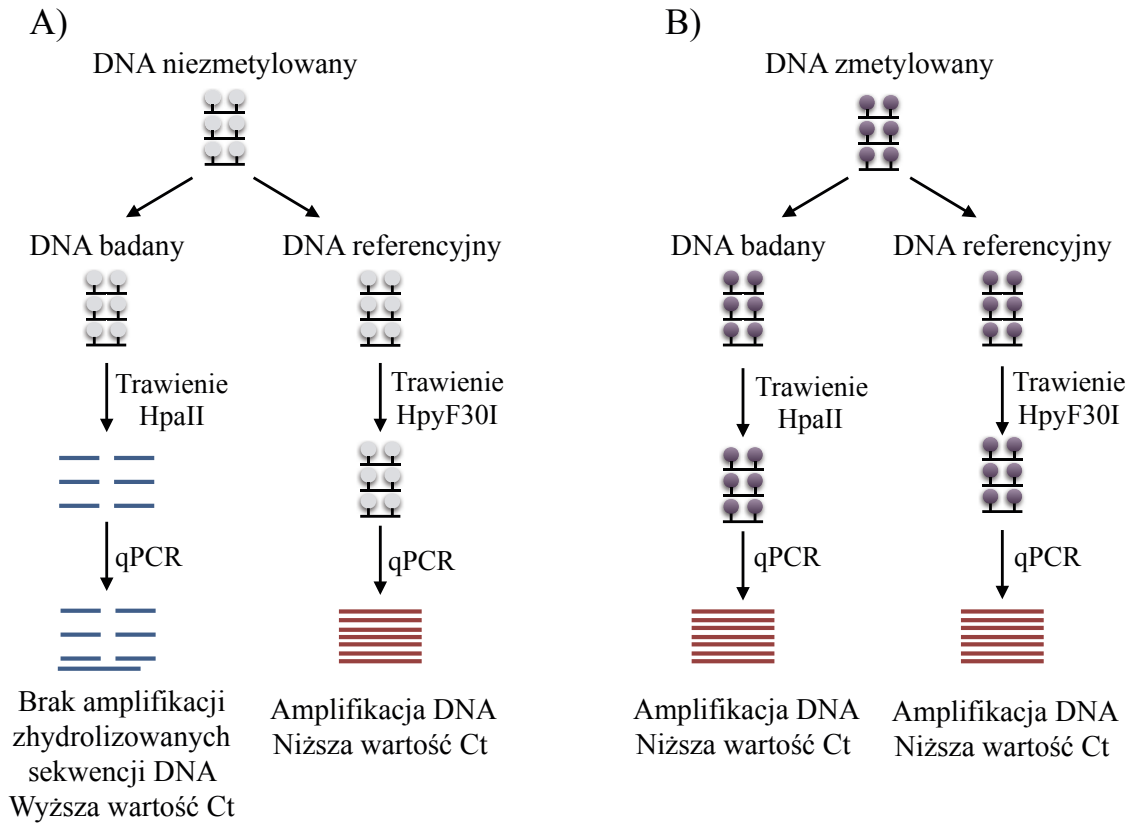
Etap reakcji qPCR	Temperatura	Czas trwania cyklu	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	96°C	5 min	1 cykl
Denaturacja w cyklu	96°C	10 sek	50 cykli
Przyłączanie starterów	62°C	20 sek	
Wydłużanie starterów	72°C	60 sek	

5.2.2.5. Interpretacja wyników reakcji qPCR

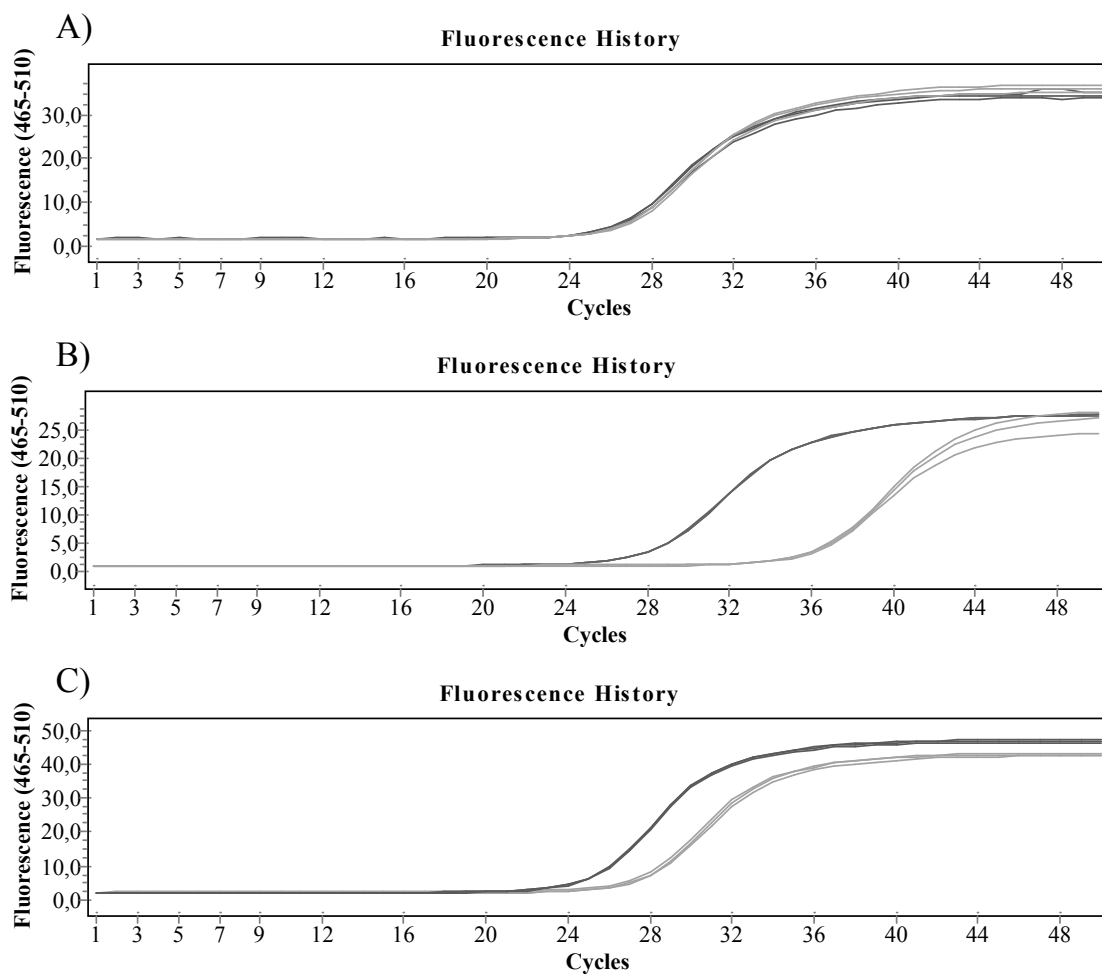
Poziom metylacji DNA badanego fragmentu genu obliczano na podstawie różnicy w cyklu granicznym (ang. *threshold cycle*, *Ct*) pomiędzy próbką badaną (DNA trawiony enzymem *HpaII*) a próbką referencyjną (DNA trawiony enzymem *HpyF30I*). Różnica w cyklu granicznym (ΔC_t) wyraża frakcję zmetylowanego DNA w badanej próbce i jest tym większa, im mniejszy jest stopień metylacji DNA w amplifikowanym locus. Poziom metylacji DNA wyrażano w % na podstawie następującego wzoru:

$$\% \text{ zmetylowanego DNA w amplifikowanym locus} = 100 \times 2^{-\Delta C_t}$$

Schemat przeprowadzonego doświadczenia przedstawiono na ryc. 11 i 12.



Ryc. 11. Schemat badania poziomu metylacji DNA za pomocą metody MSRE-qPCR. **A)** W przypadku braku metylacji DNA w badanym locus następuje trawienie sekwencji 5'-CCGG-3' przez enzym *HpaII*. Następstwem trawienia jest brak amplifikacji zhydrolizowanych sekwencji DNA w reakcji qPCR i wysoka wartość Ct. **B)** W przypadku gdy wewnętrzna cytozyna w tetranukleotydzie 5'-CCGG-3' jest zmetrylowana trawienie przez enzym *HpaII* jest zahamowane. DNA matrycowy pozostaje niezmienny i amplifikuje w reakcji qPCR, przy niskiej wartości Ct. W obu przypadkach DNA referencyjny trawiony jest enzymem *HpyF30I*, którego miejsce cięcia nie znajduje się w obrębie żadnego z amplikonów. W reakcji qPCR dochodzi zatem do prawidłowej amplifikacji DNA w badanym locus. Celem trawienia enzymem *HpyF30I* DNA kontrolnego jest uzyskanie krótszych fragmentów DNA, co pozwala na bardziej precyzyjny pomiar ilościowy produktów qPCR. Zmodyfikowano na podstawie procedury badania metylacji DNA, dołączonej do zestawu OneStep qMethyl™ (Zymo Research Corp, USA)



Ryc. 12. Interpretacja wyników ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy. Frakcja zmetylowanego DNA w badanej próbce jest obliczana na podstawie różnicy w cyklu granicznym (ΔC_t) pomiędzy próbką badaną (DNA trawiony enzymem *HpaII*) a próbką referencyjną (DNA trawiony enzymem *HpyF30I*). **A)** DNA w pełni zmetylowany (trawienie przez *HpaII* jest zahamowane, $\Delta C_t \approx 0$), **B)** DNA niezmetrylowany (DNA badany uległ trawieniu przez *HpaII*, $\Delta C_t > 4.5$), **C)** częściowa metylacja DNA (w badanej próbce trawieniu uległa frakcja DNA, $0 < \Delta C_t < 4.5$). Zmodyfikowano na podstawie procedury badania metylacji DNA, dołączonej do zestawu EpiJET DNA Methylation Analysis Kit *MspI/HpaII* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

5.2.3. Analiza statystyczna danych

Analizę statystyczną wyników MSRE-qPCR wykonano w programie STATISTICA 10 (StatSoft, USA).

- Ze względu na to, że rozkłady stopnia metylacji DNA spełniały założenie rozkładu normalnego, do oceny różnic między średnimi wartościami analizowanej zmiennej w grupie badanej i w grupie kontrolnej zastosowano parametryczny test T-Studenta.

- Określono związek pomiędzy poziomem metylacji DNA w obrębie regionów 1, 2 i 4 genu *HTT* a wybranymi parametrami klinicznymi i molekularnymi choroby. Z uwagi na to, że w regionie 3 nie stwierdzono metylacji DNA, nie został on uwzględniony w poniższych analizach statystycznych. Przeprowadzono następujące analizy:

- ocenę zależności poziomu metylacji DNA w badanym regionie *HTT* od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby (wyrażonym jako różnica pomiędzy wiekiem chorego a AOO) oraz liczby CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n),

- określenie wpływu stopnia metylacji DNA na wiek zachorowania pacjenta (AOO), z uwzględnieniem wpływu liczby powtórzeń CAG,

- określenie wpływu stopnia metylacji DNA na punktację w trzech domenach skali UHDRS (ang. *The Unified Huntington's Disease Rating Scale*), mierzoną wskaźnikami TMS (ang. *Total Motor Score*), TFC (ang. *Total Functional Capacity*) oraz SF (ang. *Functional Score*), z uwzględnieniem następujących wejściowych zmiennych niezależnych:

- płci (w postaci ocyfrowanej: 0 – kobieta, 1 – mężczyzna),
- (CAG)_n (w postaci zlogarytmizowanej),
- wieku pacjenta,
- PM1 – poziomu metylacji DNA w regionie 1,
- PM2 – poziomu metylacji DNA w regionie 2,
- PM4 – poziomu metylacji DNA w regionie 4.

W modelach tych nie uwzględniono wieku zachorowania jako zmiennej niezależnej, gdyż zmienna ta jest silnie skorelowana z $(CAG)_n$.

Badania zostały przeprowadzone w ramach jedno- i wieloczynnikowych modeli regresji liniowej. Zmienne AOO i $(CAG)_n$ zostały uprzednio zlogarytmizowane. Liniowa zależność pomiędzy logarytmami tych zmiennych odpowiada potęgowemu modelowi regresji pomiędzy zmiennymi niezlogarytmizowanymi. W przypadku modeli regresji wielorakiej wykorzystano metodę eliminacji wstecznej opartej o skorygowany współczynnik determinacji R^2 .

Wszystkie wyżej wymienione analizy przeprowadzono w całej populacji chorych ($n=151$), a także osobno, w grupie chorych z $(CAG)_n \leq 50$ ($n=137$), stosując analogię to badań, przedstawionych w rozdziale 5.1. i 6.1. Pomimo usunięcia skrajnych wartości zmiennej $(CAG)_n$ rozkłady reszt w analizowanych modelach, a także rozpatrywanych zmiennych przed i po zlogarytmizowaniu, nie spełniały założeń rozkładu normalnego. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę dużą liczbę badanych chorych, wnioskowanie o istotności czynników, oparte o t-statystykę nie jest obarczone znaczącym błędem [Faraway, 2002].

5.3. Badanie metylacji genu *HTT* metodą mikromacierzy metylacyjnych

5.3.1. Materiał

Analizę stopnia metylacji genu *HTT* metodą mikromacierzy metylacyjnych przeprowadzono u 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz u 16 zdrowych ochotników, odpowiadających wiekiem oraz płcią grupie badanej. Próbkę DNA pochodziły z puli materiału genetycznego, zgromadzonego od 151 objawowych chorych i 117 osób zdrowych. Pacjenci zostali zakwalifikowani do badania według następującej procedury: na podstawie liczby powtórzeń CAG w nieprawidłowym allelu *HTT* wszystkich objawowych chorych, od których uzyskano DNA, podzielono na dwie grupy: osoby z $(CAG)_n \leq 44$ oraz osoby z $(CAG)_n \geq 45$. Z obu grup wybrano do badań losowo tę samą liczbę kobiet i mężczyzn, którzy w momencie pobrania krwi byli w zbliżonym wieku. Dobór pacjentów na podstawie powyższych kryteriów miał na celu zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia zmian w poziomie metylacji, wynikających z różnic

wieku i płci chorych. Z danych literaturowych wynika bowiem, że takie czynniki jak: wiek, płeć oraz pochodzenie etniczne mogą wpływać na zmiany w obrębie metylomu [Hannum i wsp., 2013]. Charakterystykę grup przedstawiono w tab. 12.

Tab. 12. Charakterystyka osób, u których oznaczono profil metylacji genu *HTT* metodą mikromacierzy metylacyjnych

Grupa	Liczba pacjentów			Wiek (lata)				(CAG) _n			
	Ogółem	K	M	Średnia	SD	Min	Max	Średnia	SD	Min	Max
(CAG) _n ≤ 44	16	8	8	50,62	2,65	46	55	42,81	0,65	42	44
(CAG) _n ≥ 45	16	8	8	33,68	7,76	16	45	51,18	8,01	45	75
Grupa kontrolna	16	8	8	42,12	9,9	24	54				

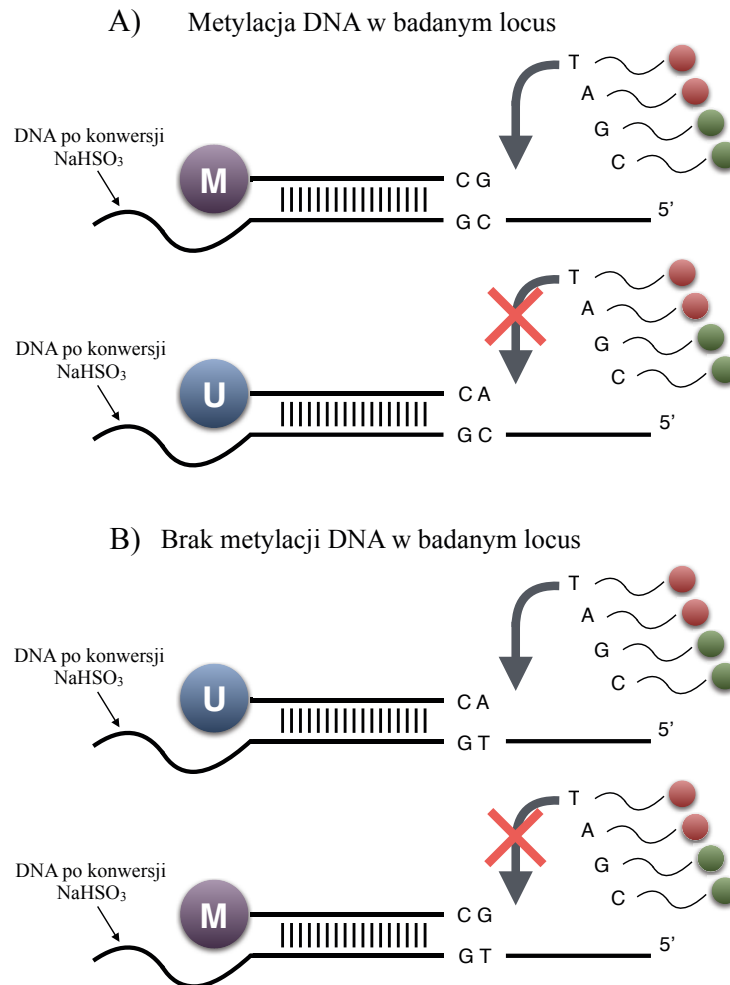
(CAG)_n – liczba CAG w zmutowanym allelu *HTT*; **K** – kobiety, **M** – mężczyźni, **SD** – odchylenie standardowe, **Min** – wartość minimalna, **Max** – wartość maksymalna

5.3.2. Metody

5.3.2.1. Oznaczenie stopnia metylacji genu *HTT*

Profil metylacji genu *HTT* został zbadany za pomocą mikromacierzy Infinium HumanMethylation450 BeadChip firmy Illumina, w laboratorium Center for Genome Technology, Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, USA. Platforma Infinium 450K służy do analizy poziomu metylacji DNA w ponad 485 000 miejsc CpG w genomie. Największa liczba sond naniesionych na płytkę mikromacierzową została zaprojektowana dla dinukleotydów CpG zlokalizowanych w regionach promotorowych, pokrywając 96% całkowitej liczby wysp CpG w genomie. Dodatkowo, mikromacierz ta umożliwia określenie stopnia metylacji DNA na brzegach wysp (ang. *island shores*), w obszarach je okalających (ang. *island shelves*), w regionach 3' i 5' genów oraz w wybranych fragmentach sekwencji kodujących. W obrębie genu *HTT* poziom metylacji DNA jest analizowany w 58 dinukleotydach CpG. Sondy mikromacierzowe zlokalizowane są w następujących fragmentach genu: 10 w regionie promotorowym, 2 w eksonie pierwszym, 42 w dalszych sekwencjach genu (ang. *gene body*) oraz 4 w obszarze 3'UTR (wg bazy UCSC Genome Browser). Do badania wykorzystywany jest DNA poddany konwersji wodorosiar-

czynem sodu. Schemat analizy metylacji DNA z zastosowaniem wybranej platformy przedstawiono na ryc. 13. Poziom metylacji DNA jest obliczany za pomocą oprogramowania Illumina GenomeStudio® Methylation Module v1.0 i wyrażany jako odsetek zmetylowanego DNA w badanej próbce, gdzie 0 oznacza brak metylacji, a 1- całkowitą metylację w badanym locus.



Ryc. 13. Procedura badania metylacji DNA The Infinium Methylation Assay (Illumina). Mikro-macierz Infinium HumanMethylation450 BeadChip wykorzystuje dwa typy sond do detekcji metylacji DNA- sondę U do detekcji niezmetrylowanego miejsca CpG oraz sondę M, która rozpoznaje sekwencję zmetylowaną. **A)** W przypadku metylacji DNA w badanym locus przyłączenie sondy M umożliwia wydłużanie sekwencji startera w kierunku 3'. Po przyłączeniu sondy U dochodzi do niesparowania zasad na końcu 3' startera i wstrzymania elongacji. **B)** Jeśli cytozyna w badanym locus jest niezmetrylowana działanie sond U i M jest odwrotne. Dideoksynukleotydy wbudowywane do wydłużanej sekwencji są wyznakowane fluorescencją. Poziom metylacji DNA w danym locus obliczany jest na podstawie proporcji sygnałów fluorescencyjnych dla zmetylowanych i niezmetrylowanych miejsc CpG.

5.3.2.2. Analiza statystyczna danych mikromacierzowych

Wstępne opracowanie danych mikromacierzowych, w tym normalizację danych, wykonano w laboratorium Center for Genome Technology Uniwersytetu w Miami. Analiza statystyczna została przeprowadzona w programie STATISTICA 10 (StatSoft, USA). Z analizy wykluczono sekwencje, w których występuje polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, *ang. single nucleotide polymorphism*) według oprogramowania Illumina GenomeStudio® Methylation Module v1.0. Badanie przeprowadzono na poziomie istotności 0,05.

- Na podstawie przeglądu literatury, dotyczącej metod analizy statystycznej danych mikromacierzowych [Hannum i wsp., 2013; Huynh i wsp., 2014] do oceny różnic między średnimi wartościami analizowanej zmiennej w grupie badanej i w grupie kontrolnej wybrano parametryczny test T-Studenta.

- Średnie poziomy metylacji DNA w obrębie trzech grup: chorych z $(CAG)_n \leq 44$, chorych z $(CAG)_n \geq 45$ oraz grupy kontrolnej, porównano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA, *ang. analysis of variance*), z ewentualnym zastosowaniem testu wielokrotnych porównań Tukeya w przypadku wystąpienia istotnych różnic pomiędzy grupami. Homogeniczność wariancji w grupach została sprawdzona za pomocą testu Levene'a.

- Określono związek pomiędzy poziomem metylacji genu *HTT* a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. Do badania wybrano 5 dinukleotydów CpG, w których maksymalne różnice w poziomie metylacji DNA przekraczały 10%, w grupie pacjentów z HD. Wykonano następujące analizy statystyczne:

- ocenę zależności poziomu metylacji DNA w danym CpG od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby (wyrażonym jako różnica pomiędzy wiekiem chorego a AOO) oraz liczby CAG w zmutowanym allelu *HTT*,

- określenie zależności wieku zachorowania pacjenta (AOO) od liczby powtórzeń CAG i poziomu metylacji DNA w wybranym CpG.

Badania przeprowadzono w ramach jedno- i wieloczynnikowych modeli regresji liniowej. Zmienne AOO i $(CAG)_n$ zostały uprzednio zlogarytmizowane. Testem

Kołmogorowa-Smirnowa odrzucono hipotezę o rozkładzie normalnym wieku oraz czasu trwania choroby. Rozkłady zmiennych $\text{Ln}(\text{AOO})$ oraz stopnia metylacji 5 wybranych CpG spełniały założenie rozkładu normalnego. Z analizy statystycznej wykluczono pacjenta z liczbą powtórzeń 75, ze względu na znacznie odstającą wartość $(\text{CAG})_n$. Mimo to nie uzyskano rozkładu normalnego zmiennej $(\text{CAG})_n$ oraz reszt modelu. Biorąc pod uwagę stosunkowo niewielką liczbę chorych ($n=31$) wnioskowanie statystyczne było zatem obarczone znacznym ryzykiem wystąpienia błędu.

6. WYNIKI

6.1. Wpływ wybranych czynników klinicznych i molekularnych na wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*)

Badania statystyczne przeprowadzono w populacji 452 polskich pacjentów z chorobą Huntingtona, u których liczba powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* wynosiła ≥ 36 , a także określony został wiek zachorowania przez badaczy EHDN. Z uwagi na większy udział modyfikujących czynników genetycznych i środowiskowych w przebiegu choroby wśród chorych z krótszymi allelami, badania te przeprowadzono również w grupie pacjentów z liczbą powtórzeń CAG ≤ 50 . W analizie statystycznej zastosowano jedno- i wieloczynnikowe modele regresji liniowej.

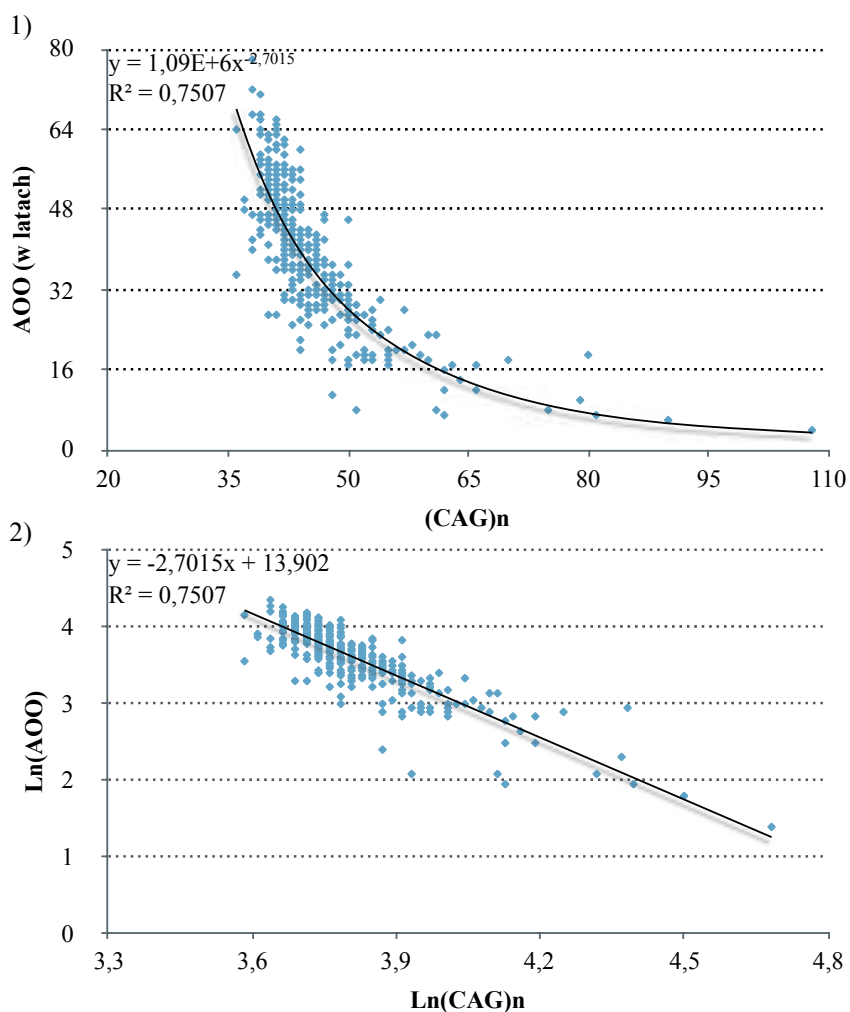
6.1.1. Analizy kliniczne, przeprowadzone w całej grupie chorych

6.1.1.1. Zależność wieku zachorowania od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT*

Wpływ liczby powtórzeń CAG na wiek zachorowania (AOO) określono w grupie 452 chorych. Model regresji przyjął postać:

$$\ln(AOO) = 13,90 - 2,70 \ln(CAG)_n.$$

Model jest istotny ($F=1354,7$, $p<0,01$) i wyjaśnia 75,1% zmienności zmiennej zależnej $\ln(AOO)$ (ryc. 14). Zmienna $\ln(CAG)_n$ jest istotna na poziomie $p<0,01$. Wzrost $\ln(CAG)_n$ o 1 oznacza zmniejszenie oczekiwanego $\ln(AOO)$ o 2,70. Dla zmiennych niezlogarytmizowanych oznacza to, że wzrost liczby powtórzeń CAG o 2,5% (np. o jedno powtórzenie przy $(CAG)_n=40$) oznacza zmniejszenie oczekiwanego wieku zachorowania o 6,45% (o około 3,32 lata). W tab. 13 przedstawiono oczekiwane wartości AOO dla nosicieli wybranych alleli w genie *HTT*.



Ryc 14. Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona (n=452), **1**) – dla zmiennych surowych (potęgowy model regresji), **2**) – dla zmiennych zlogarytmizowanych (linearyzowany model regresji). Zmienna (CAG)_n wyjaśnia w tej grupie 75,1% zmienności w wieku pojawienia się objawów klinicznych HD.

Tab.13. Oczekiwany wiek zachorowania (AOO) wśród nosicieli wybranych alleli w genie *HTT* oraz zmiany w AOO, wywołane zwiększeniem liczby powtórzeń CAG ((CAG)_n). Parametr AOO podano w latach

(CAG) _n	Oczekiwany AOO	Zmiana
36	68,34	
37	63,47	-4,87
40	51,42	
41	48,10	-3,32
60	17,21	
61	16,46	-0,75

6.1.1.2. Wpływ płci chorego rodzica na wiek zachorowania pacjenta

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między średnimi wartościami zmiennych AOO oraz $(CAG)_n$ w grupie chorych, którzy odziedziczyli mutację od matki oraz w grupie chorych, którzy odziedziczyli mutację od ojca ($n=181$ vs. $n=194$, $p>0,05$).

Zależność AOO od liczby powtórzeń CAG oraz płci chorego rodzica została zbadana wśród 375 pacjentów, dla których znane było rodzicielskie pochodzenie zmutowanego allela. Model regresji obejmował zależność $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ oraz dodatkowego czynnika:

- płci rodzica z HD = 0, jeśli wskazano matkę ($n=181$),
- płci rodzica z HD = 1, jeśli wskazano ojca ($n=194$).

Badanie nie wykazało, aby płeć chorego rodzica, obok liczby powtórzeń CAG, miała istotny wpływ na wiek zachorowania pacjenta (t -statystyka=1,26, $p=0,21$) (tab. 14). Włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało wzrost wartości skorygowanego R^2 jedynie o 0,001 (tab. 17).

Tab. 14. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ i płci chorego rodzica. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=375	b	SE	t	p
W. wolny	13,7490	0,3011	45,6585	< 0,01
$\ln(CAG)_n$	-2,6695	0,0793	-33,6833	< 0,01
Płeć rodzica z HD	0,0281	0,0222	1,2630	0,2073
Dopasowanie modelu				
R^2	0,754		F	569,78
R^2_{adj}	0,753		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t ; **p** – poziom istotności; R^2 – współczynnik determinacji; R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

6.1.1.3. Zależność wieku zachorowania pacjenta od obecności choroby u rodzica, bez względu na jego płeć

W grupie pacjentów, u których choroba Huntingtona występowała u jednego z rodziców stwierdzono istotnie wcześniejszy wiek zachorowania (AOO) w porównaniu do grupy chorych z nieobciążonym wywiadem rodzinnym ($n=375$ vs. $n=53$, $p<0,01$). Chorzy Ci charakteryzowali się także większą liczbą powtórzeń CAG w zmutowanym allelu ($p<0,01$). Średni wiek zachorowania i $(CAG)_n$ w grupie chorych, u których jeden z rodziców chorował wynosiły odpowiednio 39,21 lat i 45,62 powtórzeń, natomiast wśród pacjentów z nieobciążonym wywiadem rodzinnym – 49,24 lat i 42,56 powtórzeń.

Wpływ występowania choroby u rodzica na wiek zachorowania pacjenta, obok liczby powtórzeń CAG, zbadano w grupie 428 chorych. Model regresji obejmował zależność $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ oraz dodatkowego czynnika:

- HD u rodzica = 1, jeśli wskazano matkę lub ojca ($n=375$),
- HD u rodzica = 0, jeśli wskazano „żaden” ($n=53$).

Stwierdzono statystycznie istotny wpływ występowania choroby u rodzica na wiek zachorowania pacjenta. Włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało wzrost wartości skorygowanego R^2 o 0,007 (tab. 17). Model regresji przyjął postać:

$$\ln(AOO) = 13,77 - 2,64 \ln((CAG)_n) - 0,11HD \text{ u rodzica.}$$

Model jest istotny ($F=667,5$, $p<0,01$) i wyjaśnia 75,9% zmienności zmiennej zależnej $\ln(AOO)$ (tab. 15). Obie zmienne są istotne na poziomie $p<0,01$. Oczekiwany $\ln(AOO)$ pacjenta, który miał chorego rodzica jest o 0,11 mniejszy w porównaniu do pacjenta z nieobciążonym wywiadem rodzinnym. Dla zmiennych niezlogarytmizowanych oznacza to, że wiek zachorowania jest wcześniejszy średnio o 10,4%.

Tab. 15. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i występowania choroby u rodzica. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=428	b	SE	t	p
W. wolny	13,7678	0,2811	48,9789	< 0,01
$\text{Ln}(\text{CAG})_n$	-2,6408	0,0746	-35,3887	< 0,01
HD u rodzica	-0,1137	0,0308	-3,6905	< 0,01
Dopasowanie modelu				
R^2	0,759		F	667,50
R^2_{adj}	0,757		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t; **p** – poziom istotności; R^2 – współczynnik determinacji; R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

6.1.1.4. Zależność wieku zachorowania pacjenta od wieku zachorowania rodzica

Wpływ wieku zachorowania rodzica na AOO pacjenta został określony w grupie 329 chorych. Model regresji obejmował zależność $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i dodatkowego parametru $\text{Ln}(\text{AOO}$ rodzica).

Wykazano statystycznie istotną zależność wieku zachorowania pacjenta od AOO rodzica. Włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało wzrost wartości skorygowanego R^2 o 0,042 (tab. 17). Model regresji przyjął postać:

$$\text{Ln}(\text{AOO}) = 10,38 - 2,15 \text{Ln}(\text{CAG})_n + 0,38 \text{Ln}(\text{AOO} \text{ Rodzica}).$$

Model jest istotny ($F=604,7,8$, $p<0,01$) i wyjaśnia 78,8% zmienności zmiennej zależnej $\text{Ln}(\text{AOO})$ (tab. 16). Obie zmienne są istotne na poziomie $p<0,01$. Wzrost $\text{Ln}(\text{AOO}$ Rodzica) o 1 powoduje wzrost $\text{Ln}(\text{AOO})$ pacjenta o 0,36. Dla zmiennych niezlogarytmizowanych oznacza to, że wzrost wieku zachorowania rodzica o 10% powoduje wzrost oczekiwanego AOO pacjenta o 3,69%.

Tab. 16. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i wieku zachorowania rodzica. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=329	b	SE	t	p
W. wolny	10,3782	0,5059	20,5134	< 0,01
$\text{Ln}(\text{CAG})_n$	-2,1514	0,0998	-21,5506	< 0,01
$\text{Ln}(\text{AOO}$ rodzica)	0,3769	0,0463	8,1489	< 0,01
Dopasowanie modelu				
R^2	0,788		F	604,65
R^2_{adj}	0,757		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; b – niestandardowy współczynnik regresji; SE – błąd standardowy współczynnika regresji; t – wartość statystyki t; p – poziom istotności; R^2 – współczynnik determinacji; R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; F – wartość statystyki F

Tab. 17. Modelowanie zmiennej zależnej AOO w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona

Model	Zmienne	R^2_{adj}	Zmiana w R^2_{adj}	N
1	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,752	--	375
1a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + płeć rodzica z HD	0,753	0,001	
2	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,750	--	428
2a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + występowanie choroby u rodzica	0,757	0,007	
3	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,744	--	329
3a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + wiek zachorowania rodzica	0,786	0,042	

R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; N – liczebność grupy badanej

6.1.2. Wyniki analiz klinicznych, przeprowadzonych w grupie chorych z $(\text{CAG})_n \leq 50$

Badania statystyczne w grupie pacjentów z liczbą powtórzeń $\text{CAG} \leq 50$ zostały przeprowadzone w sposób analogiczny do obliczeń, które wykonano dla całej populacji chorych, tj. za pomocą jedno- i wieloczynnikowych modeli regresji liniowej.

Wyniki tych analiz są następujące:

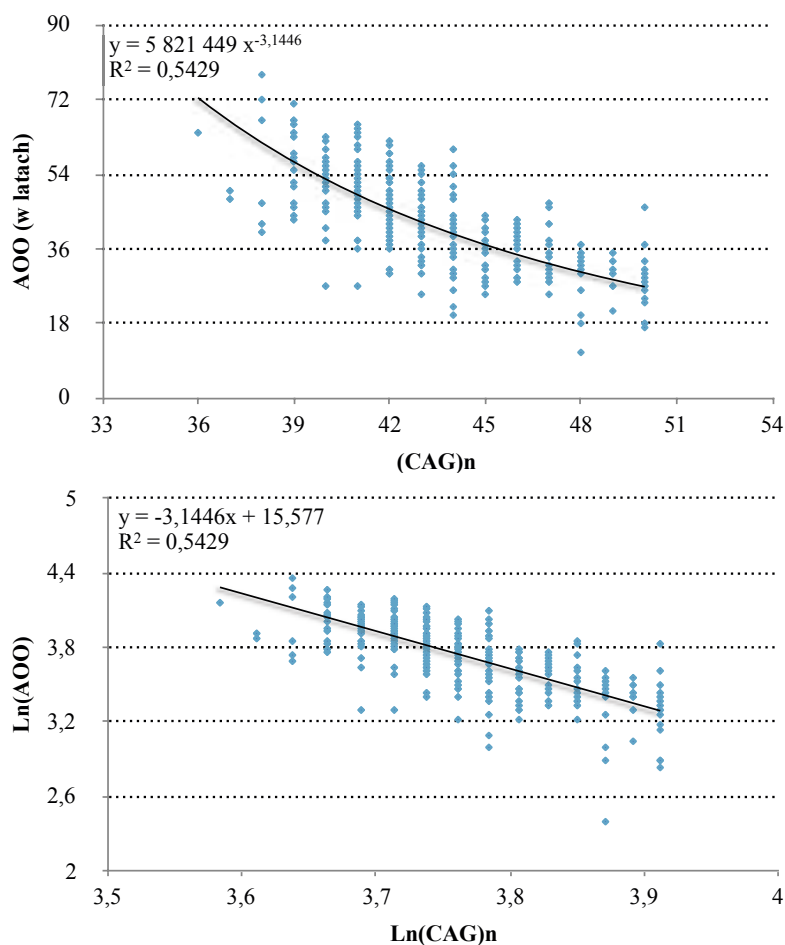
- w grupie 389 chorych z liczbą powtórzeń $CAG \leq 50$ zmienna $(CAG)_n$ wyjaśnia 54,3% zmienności AOO (ryc. 15),
- w grupie 318 chorych, dla których znane było rodzicielskie pochodzenie zmutowanego allela nie wykazano, aby płeć chorego rodzica, obok liczby powtórzeń CAG, miała istotny wpływ na wiek zachorowania pacjenta (t-statystyka=0,54, p=0,58); włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało zmniejszenie wartości skorygowanego R^2 o 0,001,
- w grupie 368 chorych, dla których znany był wywiad rodzinny stwierdzono statystycznie istotną zależność wieku zachorowania pacjenta od obecności choroby u rodzica; włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało wzrost wartości skorygowanego R^2 o 0,014,
- w grupie 280 chorych, dla których znany był wiek zachorowania rodzica, wykazano statystycznie istotną zależność wieku zachorowania pacjenta od AOO rodzica; włączenie tej zmiennej do modelu spowodowało wzrost wartości skorygowanego R^2 o 0,075.

Podsumowanie wyników regresji oraz modelowania zmiennej AOO, przeprowadzonych w grupie chorych z $(CAG)_n \leq 50$ przedstawiono w tab. 18 oraz w tab. 28-30 (Załącznik, str. 130).

Tab. 18. Modelowanie zmiennej zależnej AOO w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$

Model	Zmienne	R^2_{adj}	Zmiana w R^2_{adj}	N
1	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,529	--	318
1a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + płeć rodzica z HD	0,528	-0,001	
2	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,538	--	368
2a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + występowanie choroby u rodzica	0,552	0,014	
3	Liczba CAG w zmutowanym allelu	0,537	--	280
3a	Liczba CAG w zmutowanym allelu + wiek zachorowania rodzica	0,612	0,075	

R^2_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; N – liczebność grupy badanej



Ryc 15. Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) w grupie chorych z (CAG)_n ≤ 50 (n=389), **1** – dla zmiennych surowych (potęgowy model regresji), **2** – dla zmiennych zlogarytmizowanych (linearyzowany model regresji). Zmienna (CAG)_n wyjaśnia w tej grupie 54,3 % zmienności w wieku pojawienia się objawów klinicznych HD.

6.1.3. Podsumowanie analiz klinicznych, których celem było określenie wpływu wybranych czynników na wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*)

W ramach przeprowadzonych badań określono wpływ liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* na wiek zachorowania w grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona. W modelu regresji, w którym uwzględniono wszystkie obserwacje zmienna (CAG)_n wyjaśniała 75,1% zmienności (AOO), natomiast w grupie chorych z (CAG)_n ≤ 50 – 54,3%. Nie wykazano, aby płeć chorego rodzica, obok liczby powtórzeń CAG, istotnie wpływała na wiek zachorowania pacjentów, zarówno w grupie wszystkich chorych, jak i chorych z (CAG)_n ≤ 50. W obu tych grupach wykazano

statystycznie istotną zależność wieku zachorowania pacjenta od występowania choroby u rodzica, bez względu na jego płeć, jak również od wieku zachorowania rodzica.

6.2. Wyniki badania metylacji genu *HTT*, przeprowadzonego metodą MSRE-qPCR

6.2.1. Modyfikacja protokołu badania MSRE-qPCR

Procedurę badania stopnia metylacji genu *HTT* przeprowadzono początkowo zgodnie z protokołem producenta, dołączonym do zestawu EpiJET DNA Methylation Analysis Kit *MspI/HpaII* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). W protokole tym DNA trawiony jest dwoma enzymami: *HpaII*, który trawi sekwencję 5'-CCGG-3' w przypadku gdy cytozyna w dinukleotydzie CpG jest niezmetylowana (próbka badana), oraz *MspI*, który trawi tę sekwencję bez względu na jej stopień metylacji (kontrola negatywna). Kontrolę pozytywną (DNA referencyjny) w reakcji qPCR stanowi natomiast DNA nietrawiony. Frakcję zmetylowanego DNA w badanej próbce oblicza się na podstawie różnicy w cyklu granicznym (ΔCt) pomiędzy próbką badaną a próbką referencyjną.

Podczas przeprowadzania analiz często obserwowano zjawisko, w którym w reakcji qPCR otrzymywano wyższy sygnał fluorescencji (niższą wartość Ct) dla DNA trawionego enzymem *HpaII* w porównaniu do DNA referencyjnego (Ryc. 17, część C). Oznacza to, że w badanej reakcji otrzymywano większą ilość produktu z matrycy, która powinna ulec chociażby częściowemu trawieniu enzymem restrykcyjnym w obrębie badanego amplikonu, niż z DNA referencyjnego, który nie był poddany trawieniu. Na podstawie obliczeń poziomu metylacji DNA, opartych na różnicy w ΔCt , otrzymywano zatem wyniki przekraczające wartość 100%, a w niektórych przypadkach sięgające nawet 300%. Przyczyną obserwowanego zjawiska mogło być opóźnienie etapu denaturacji nietrawionej matrycy w reakcji qPCR względem matrycy trawionej enzymem restrykcyjnym. W dostępnej literaturze brak jest jednak opracowań, które wyjaśniałyby to zjawisko.

W celu weryfikacji hipotezy badawczej, zakładającej że stosowanie DNA nietrawionego w reakcji MSRE-qPCR wiąże się z uzyskiwaniem zawyżonych wyników poziomu metylacji DNA, przeprowadzono analizę z zastosowaniem alternatywnej

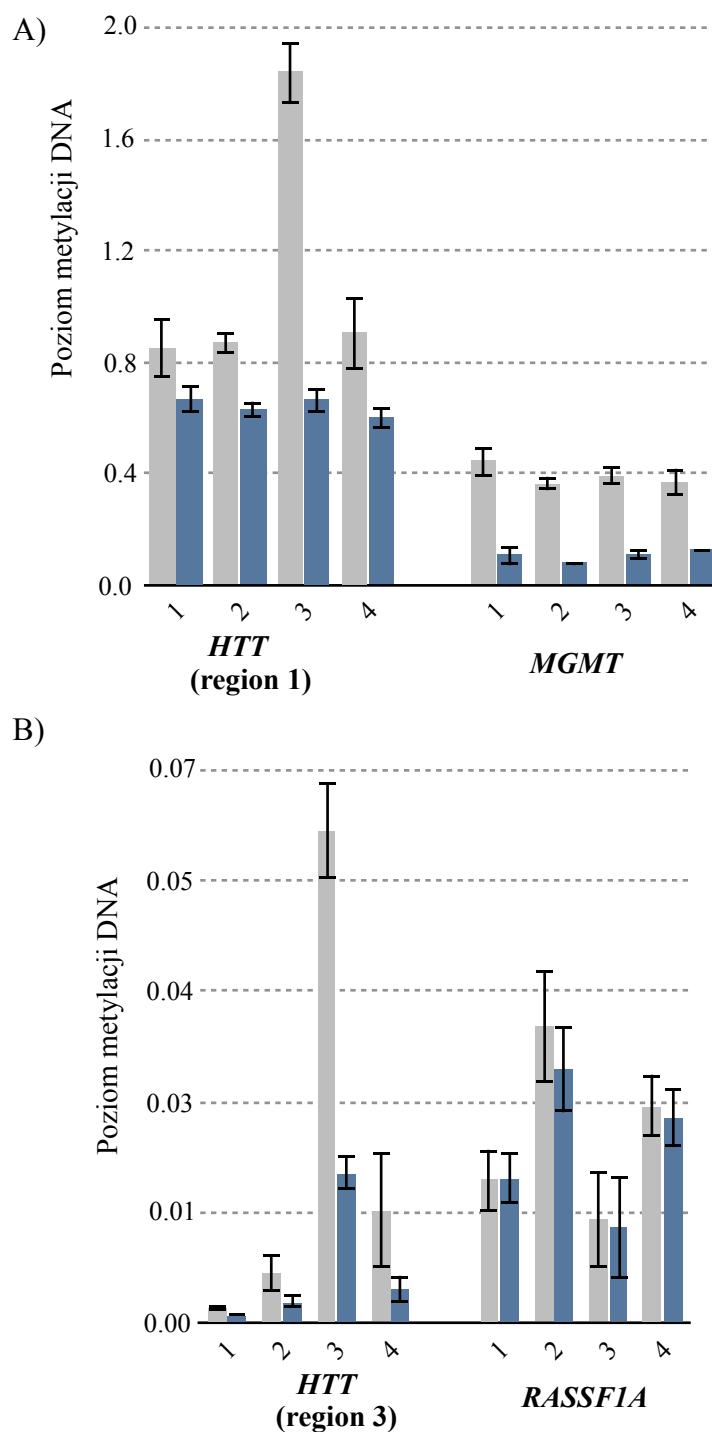
kontroli pozytywnej – DNA trawionego enzymem *HpyF30I*. Miejsce trawienia enzymu *HpyF30I* nie znajdowało się w obrębie żadnego z badanych amplikonów, a celem trawienia było uzyskanie krótszych fragmentów DNA kontrolnego, o długości porównywalnej do matrycy trawionej enzymem *HpaII*.

Stopień metylacji DNA zbadano w regionach promotorowych 4 genów: *HTT* (w regionie 1 i 3 wg ryc. 9, umieszczonej na str. 57), *MGMT* (ang. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene*), *RASSF1A* (ang. *Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1 gene*) oraz *CCND2* (ang. *G1/S-Specific Cyclin D2 gene*). Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z krwi obwodowej, pochodzącej od czterech losowo wybranych pacjentów z chorobą Huntingtona. Dla każdego pacjenta wykonano po dwie analizy, tj. z zastosowaniem DNA nietrawionego oraz DNA trawionego enzymem *HpyF30I*, stanowiących kontrolę pozytywną. Procedurę badania MSRE-qPCR oraz sposób interpretacji wyników przeprowadzono zgodnie z opisem, zamieszczonym w rozdziale Materiały i Metody (str. 55-61). Sekwencje starterów użytych do badania zawarte są w tab. 23 (Załącznik, str. 125).

Ryc. 16 przedstawia wyniki badania metylacji DNA w regionach promotorowych genów *HTT*, *MGMT* oraz *RASSF1A*. Analiza porównawcza wyników, uzyskanych z zastosowaniem dwóch różnych kontroli pozytywnych, wykazała że stosowanie DNA nietrawionego, jako referencyjnego w reakcji MSRE-qPCR, prowadziło do zawyżenia poziomu metylacji DNA w przypadku większości badanych próbek (tab. 24, Załącznik, str. 126). Zjawisko to było spowodowane obniżeniem sygnałów amplifikacji PCR (wyższych wartości Ct), uzyskanych dla nietrawionych matryc DNA w porównaniu do matryc trawionych enzymem *HpyF30I* (ryc. 17). Oznacza to, że w reakcji qPCR ilość produktu, uzyskanego z DNA nietrawionego była w każdym przypadku mniejsza niż z DNA, trawionego enzymem *HpyF30I*. Stopień zawyżenia wyników metylacji różnił się, w zależności od próbki genomowego DNA oraz sekwencji nukleotydowej badanego amplikonu. Dla genu *RASSF1A* nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy otrzymanymi wynikami. W promotorze genu *MGMT* poziom metylacji DNA był zawyżony od 1.2 do 4.8-krotnie, zaś w regionie 1 genu *HTT* od 1.3 do 2.8-krotnie. W regionie 3 *HTT* oraz w genie *CCND2* nie stwierdzono metylacji DNA, zarówno w przypadku zastosowania kontroli nietrawionej, jak

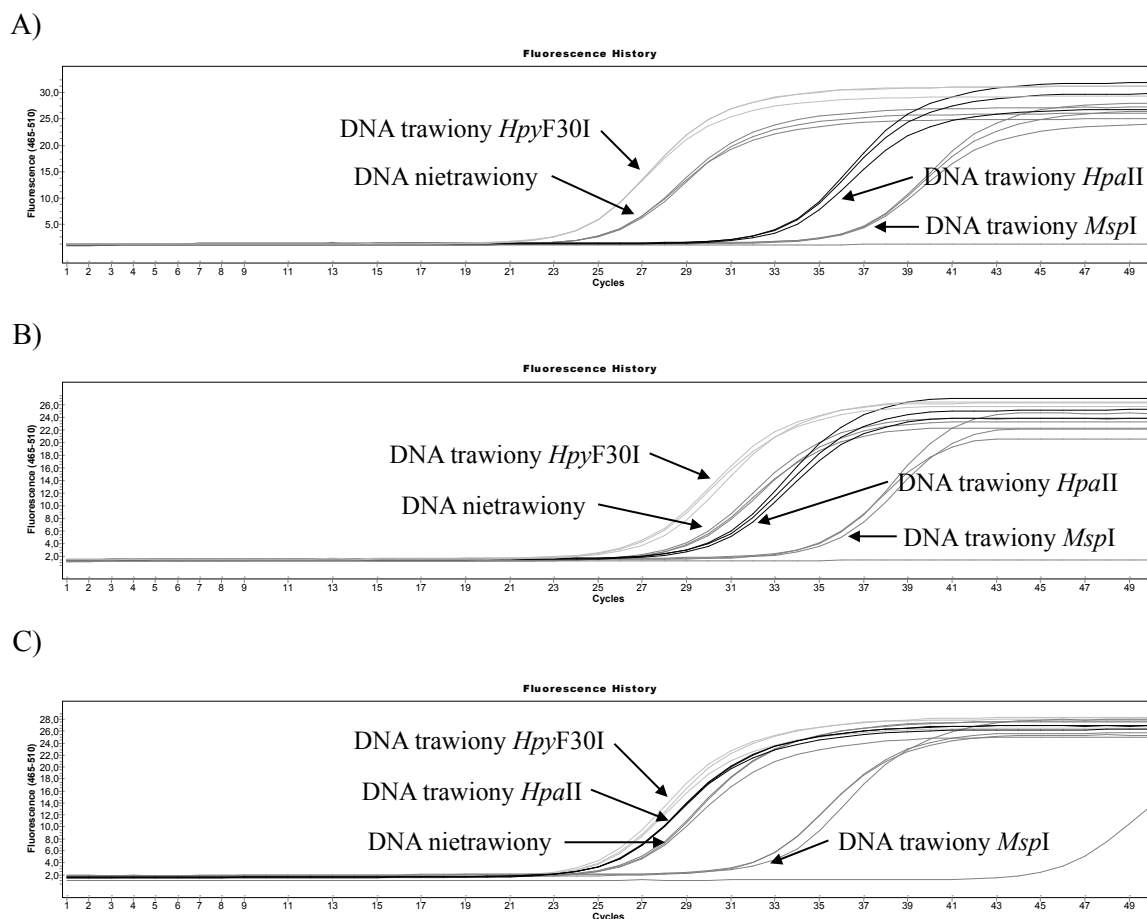
i trawionej enzymem *HpyF30I* (poziom metylacji DNA poniżej 2%). Należy jednak zaznaczyć, że w reakcji qPCR przeprowadzonej dla obu tych genów, analogicznie jak w pozostałych genach, sygnały fluorescencji były wyższe dla matryc trawionych enzymem *HpyF30I* od sygnałów, uzyskanych dla matryc nietrawionych (ryc. 17). Szczegółowe wyniki stopnia metylacji badanych genów przedstawiono w tab. 24 (Załącznik, str. 126).

Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy zmodyfikowano protokół badania metylacji DNA i jako DNA referencyjny w reakcji MSRE-qPCR zastosowano DNA trawiony enzymem restrykcyjnym, którego miejsce trawienia nie znajduje się w obrębie żadnego z badanych amplikonów. Trawienie to umożliwia bardziej precyzyjny pomiar ilościowy produktów trawienia w reakcji qPCR, poprzez uzyskanie zbliżonej fragmentacji próbek DNA badanego i kontrolnego. Przedstawioną modyfikację opublikowano w czasopiśmie *Analytical Biochemistry* [Krygier i wsp., 2016].



■ Poziom metylacji DNA z zastosowaniem kontroli pozytywnej nietrawionej
 ■ Poziom metylacji DNA z zastosowaniem kontroli pozytywnej trawionej HpyF30I

Ryc. 16. Wyniki analizy metylacji DNA, przeprowadzonej z zastosowaniem dwóch różnych próbek DNA referencyjnego, na genomowym DNA pochodzącym od czterech pacjentów (1, 2, 3, 4). **A)** region 1 genu *HTT* oraz gen *MGMT*, **B)** region 3 genu *HTT* oraz gen *RASSF1A*



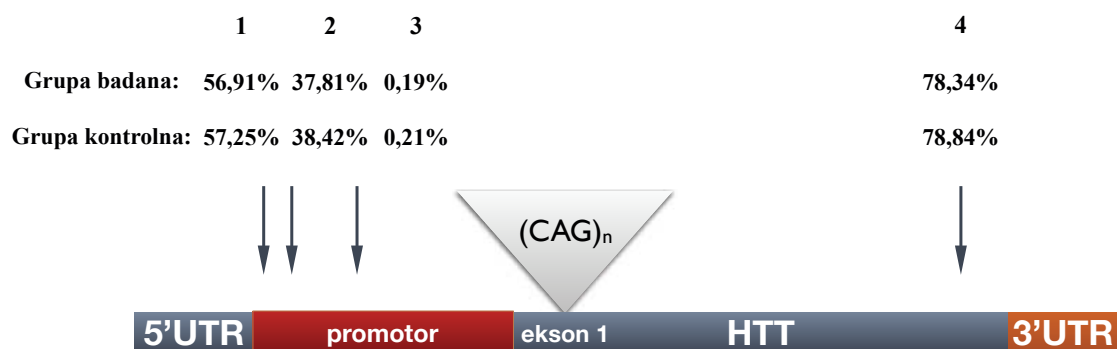
Ryc. 17. Krzywe amplifikacji produktów reakcji qPCR dla: **A)** genu *CCND2*, **B)** genu *MGMT*, **C)** genu *HTT* (region 1), przeprowadzonych na genomowym DNA pochodzącym od pacjenta nr 3. We wszystkich przedstawionych reakcjach sygnał amplifikacji PCR był wyższy dla matrycy trawionej enzymem *HpyF30I* od sygnału, uzyskanego dla matrycy nietrawionej

6.2.2. Wyniki badania MSRE-qPCR

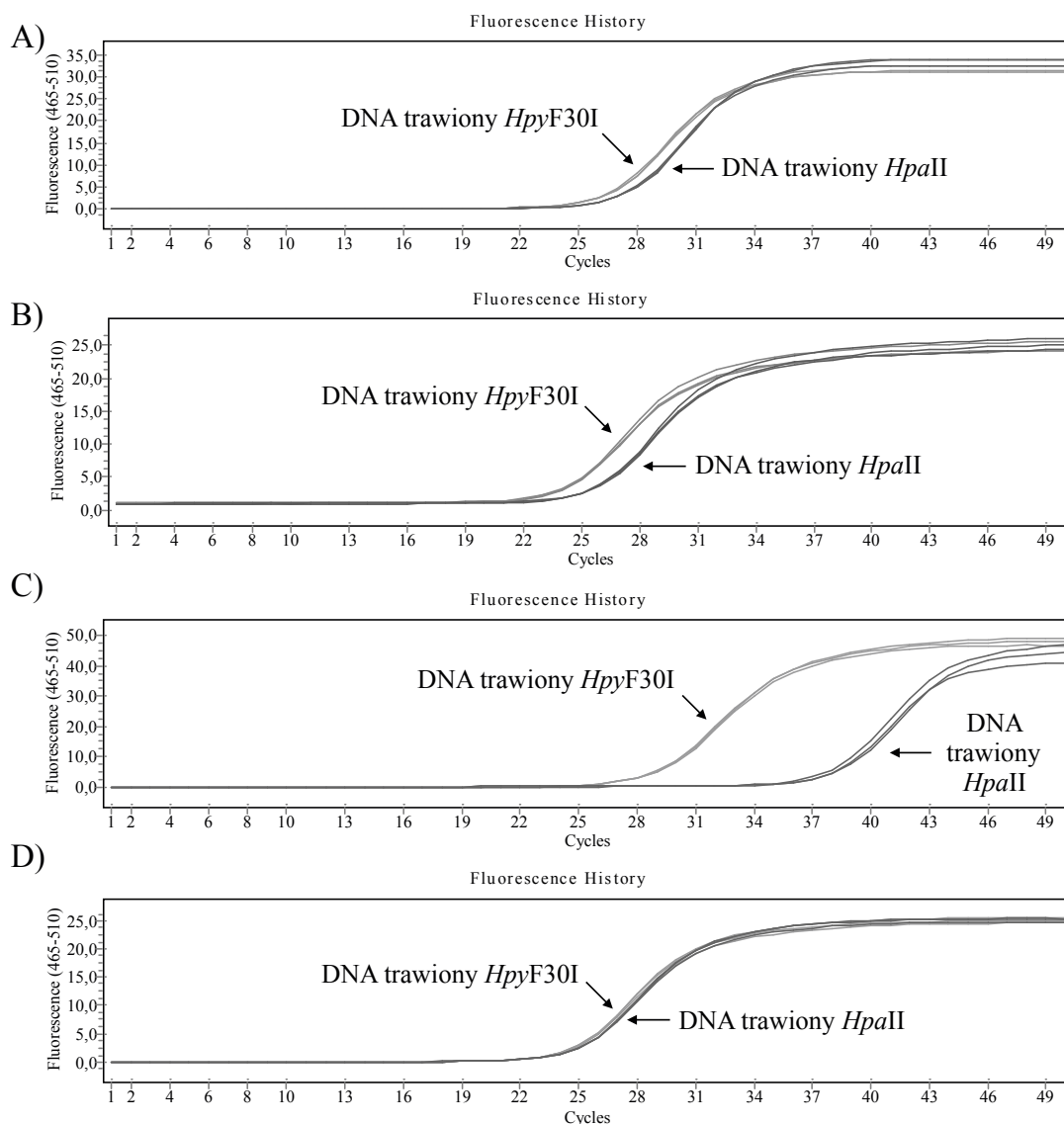
6.2.2.1. Charakterystyka grupy badanej i grupy kontrolnej pod względem stopnia metylacji DNA w genie *HTT*

Podsumowanie wyników badania metylacji, przeprowadzonego w obrębie czterech wybranych dinukleotydów CpG, przedstawiono na ryc. 18. Stopień metylacji DNA w regionach 1, 2 i 4 został określony dla całej grupy badanej i kontrolnej (odpowiednio w 151 i 117 próbkach), natomiast w przypadku regionu 3, po zbadaniu 60 pacjentów z HD i 50 osób zdrowych zrezygnowano z dalszych analiz, bowiem w żadnej próbce nie wykryto metylacji CpG.

Analiza porównawcza wyników nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami stopnia metylacji genu *HTT* w grupie badanej i w grupie kontrolnej ($p > 0,05$, test T-Studenta). W obrębie dalekiego promotora genu *HTT* (region 1) średni poziom metylacji DNA wynosił $56,91\% \pm 5,4\%$ (\pm odchylenie standardowe) w grupie badanej oraz $57,25\% \pm 5,1\%$ w grupie kontrolnej. W regionie 2, oddalonym o 207 par zasad w kierunku 3', średni stopień metylacji DNA wynosił $37,81\% \pm 6,5\%$ wśród pacjentów i $38,42\% \pm 6,4\%$ wśród osób zdrowych. W regionie 3 nie stwierdzono metylacji DNA w obu grupach (średni poziom metylacji DNA odpowiednio $0,19\% \pm 0,2\%$ i $0,21\% \pm 0,3\%$). W obrębie sekwencji kodującej *HTT* średni stopień metylacji DNA był wysoki i wynosił w grupie pacjentów $78,34\% \pm 5,8\%$, zaś w grupie kontrolnej $78,84\% \pm 5,6\%$ (region 4). Przykładowe krzywe amplifikacji produktów reakcji qPCR przedstawiono na ryc. 19. Szczegółowe wyniki stopnia metylacji DNA w czterech badanych loci zawarte są w tab. 25-27 (Załącznik, str. 127-129).



Ryc. 18. Podsumowanie wyników badania metylacji DNA, przeprowadzonego techniką MSRE-qPCR. Podane wartości oznaczają średni stopień metylacji DNA. UTR – ang. *untranslated region*



Ryc. 19. Przykładowe krzywe amplifikacji produktów reakcji qPCR dla czterech badanych dinukleotydów CpG w genie *HTT*. **A)** region 1 (próbka nr 125, stopień metylacji DNA 53,12%); **B)** region 2 (próbka nr 24, stopień metylacji DNA 33,82%); **C)** region 3 (próbka nr 34, stopień metylacji DNA 0,19%); **D)** region 4 (próbka nr 248, stopień metylacji DNA 81,67%)

6.2.2.2. Związek pomiędzy poziomem metylacji DNA a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby Huntingтона

Analizy statystyczne zostały przeprowadzone dla całej grupy objawowych chorych ($n=151$), a także wśród pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$ ($n=137$). W analizie statystycznej zastosowano jedno- i wieloczynnikowe modele regresji liniowej.

6.2.2.2.1. Ocena zależności poziomu metylacji DNA od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby oraz liczby CAG w zmutowanym allelu *HTT*

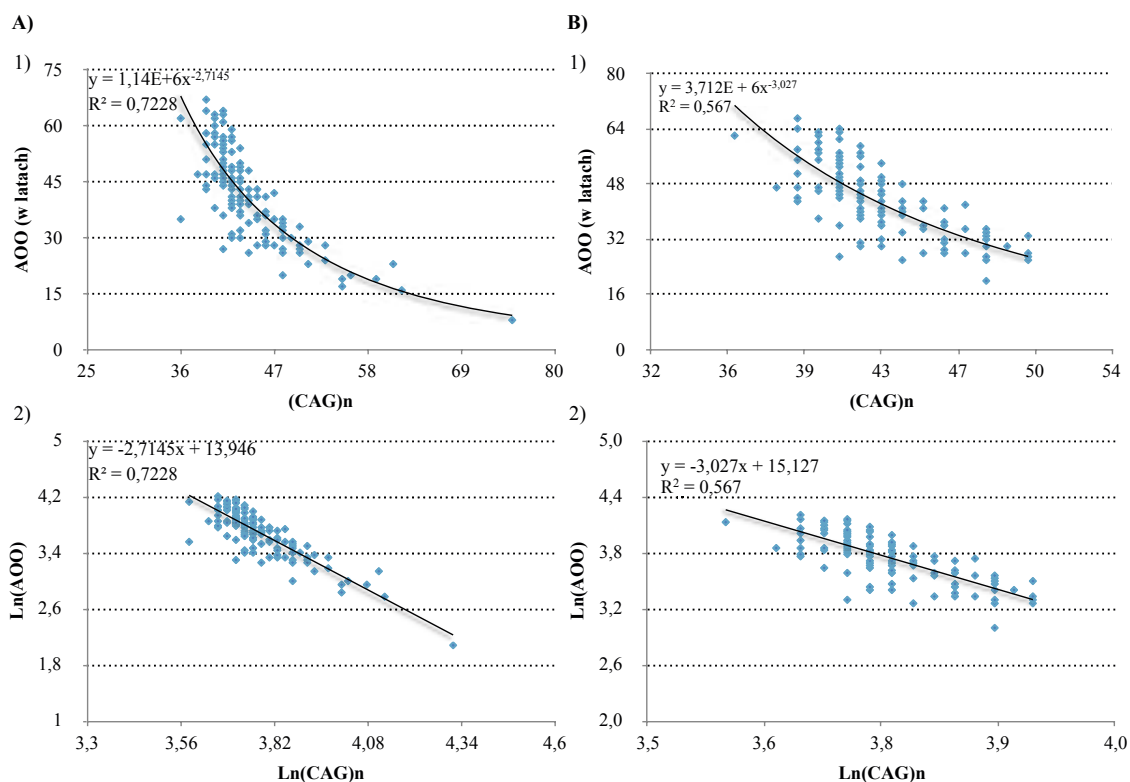
Istotność wpływu wieku pacjenta, płci, czasu trwania choroby oraz liczby CAG na stopień metylacji CpG w poszczególnych regionach *HTT* zbadano w ramach liniowych modeli regresji jednoczynnikowych. Czas trwania choroby został wyrażony jako różnica pomiędzy wiekiem chorego a wiekiem zachorowania. Liczbę CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) zastosowano w postaci zlogarytmizowanej (Ln(CAG)_n). Poziom metylacji DNA w regionie 1, 2 i 4 genu *HTT* oznaczono odpowiednio jako PM1, PM2 i PM4.

Badanie nie wykazało istotnego wpływu powyższych czynników na poziom metylacji DNA w badanych fragmentach *HTT*, zarówno w grupie wszystkich chorych, jak i chorych z (CAG)_n ≤ 50 (p > 0,05).

6.2.2.2.1. Wpływ stopnia metylacji DNA na wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*)

Na podstawie jednoczynnikowego modelu regresji liniowej ustalono, że w grupie wszystkich pacjentów liczba CAG wyjaśnia 72,3% zmienności w wieku zachorowania, a w grupie chorych z (CAG)_n ≤ 50 – 56,7% (ryc. 20). Obie zmienne występowały w modelu w postaci zlogarytmizowanej.

Analizę wpływu stopnia metylacji DNA na wiek zachorowania pacjenta przeprowadzono techniką regresji wielorakiej, z eliminacją wsteczną, opartą o skorygowany współczynnik determinacji R². W grupie wszystkich pacjentów metoda ta doprowadziła do usunięcia wszystkich trzech PM z modelu, tzn. nie stwierdzono istotnego wpływu poziomu metylacji DNA na AOO (tab. 31 i 32, Załącznik, str. 131). W grupie chorych z (CAG)_n ≤ 50 największą wartość skorygowanego R² uzyskano w modelu o dwóch zmiennych niezależnych, tzn. Ln((CAG)_n) oraz PM1, jednak nie stwierdzono istotności zmiennej PM1 (p > 0,2) (tab. 33 i 34, Załącznik, str. 132).



Ryc. 20. Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) wśród pacjentów, u których oznaczono stopień metylacji wybranych CpG metodą MSRE-qPCR. **A)** – w grupie 151 pacjentów, **B)** – w grupie 137 pacjentów z (CAG)_n ≤ 50, **1)** – dla zmiennych surowych (potęgowy model regresji), **2)** – dla zmiennych zlogarytmizowanych (linearyzowany model regresji)

6.2.2.2.2. Ocena związku pomiędzy punktacją w skalach zaawansowania choroby a stopniem metylacji DNA w genie *HTT*

Przeprowadzono analizę wpływu stopnia metylacji DNA na punktację w następujących domenach skali UHDRS (ang. *The Unified Huntington's Disease Rating Scale*): skali zaburzeń ruchowych TMS, skali ogólnej sprawności funkcjonalnej TFC oraz Skali Funkcjonowania (SF). Zastosowano technikę liniowej regresji wielorakiej z eliminacją wsteczną, opartą o skorygowany współczynnik R^2 . W modelu regresji zastosowano następujące wejściowe zmienne niezależne: płeć, wiek, liczba CAG w postaci zlogarytmizowanej ($\text{Ln}(\text{CAG})_n$) oraz poziom metylacji DNA w badanym regionie *HTT* (PM1, PM2 i PM4). Dla wszystkich skal istotnymi zmiennymi okazały się być wiek oraz liczba powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT*. Nie stwierdzono istotnego wpływu płci oraz stopnia metylacji DNA w badanych

regionach *HTT* na żadną z wymienionych skal. Poniżej przedstawiono podsumowanie optymalnych modeli regresji, obliczonych w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$. Szczegółowe wyniki przeprowadzonej analizy w obu grupach chorych umieszczono w tab. 31-34 (Załącznik, str. 131 i 132).

- Dla skali zaburzeń ruchowych TMS optymalny model wyjaśnia 19,8% zmienności TMS. Zmienne $\ln((CAG)_n)$ oraz wiek są istotne na poziomie $p < 0,01$. Wzrost $\ln((CAG)_n)$ o 0,1 (np., w przybliżeniu, wzrost liczby powtórzeń CAG z 39 do 43) oznacza zwiększenie oczekiwanej punktacji w skali TMS o 23,3. Wzrost wieku o 1 rok powoduje wzrost oczekiwanej punktacji w skali TMS o 1,38. Pomimo, że poziom metylacji DNA w regionie 4 pozostał w optymalnym modelu, nie stwierdzono jego istotnego wpływu na punktację w skali TMS.
- Dla skali TFC optymalny model wyjaśnia 17,6% zmienności TFC. Zmienne $\ln((CAG)_n)$ oraz wiek są istotne na poziomie $p < 0,01$. Wzrost wieku o 1 rok powoduje zmniejszenie oczekiwanej punktacji w skali TFC o 0,21. Wzrost $\ln((CAG)_n)$ o 0,1 (np., w przybliżeniu, wzrost liczby powtórzeń CAG z 39 do 43) oznacza zmniejszenie oczekiwanej punktacji w skali TFC o 2,90.
- Dla Skali Funkcjonowania (SF) optymalny model wyjaśnia 21,0% zmienności SF. Zmienne $\ln((CAG)_n)$ oraz wiek są istotne na poziomie $p < 0,01$. Wzrost wieku o 1 rok oznacza zmniejszenie oczekiwanej punktacji w skali SF o 0,40. Wzrost $\ln((CAG)_n)$ o 0,1 (np., w przybliżeniu, wzrost CAG z 39 do 43) powoduje zmniejszenie oczekiwanej punktacji w skali SF o 5,54. Pomimo, że płeć pozostała w optymalnym modelu, nie stwierdzono jej istotnego wpływu na punktację w skali SF6.

6.2.3. Podsumowanie wyników badania metylacji genu *HTT*, przeprowadzonego metodą MSRE-qPCR

W ramach przeprowadzonego badania określono stopień metylacji czterech wybranych dinukleotydów CpG w obrębie genu *HTT*. Analiza porównawcza wyników nie wykazała istotnych statystycznie różnic między średnimi wartościami stopnia metylacji DNA w grupie pacjentów z HD i w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono również

istotnego statystycznie związku pomiędzy stopniem metylacji CpG a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. Na podstawie wyników badań molekularnych opracowano zmodyfikowany protokół badawczy, który umożliwił bardziej precyzyjny pomiar ilościowy produktów w reakcji qPCR, poprzez uzyskanie zbliżonej fragmentacji próbek DNA badanego i kontrolnego.

6.3. Wyniki badania metylacji genu *HTT*, przeprowadzonego metodą mikromacierzy metylacyjnych

Poziom metylacji DNA został określony dla 58 dinukleotydów CpG. W obrębie 19 sekwencji stwierdzono występowanie polimorfizmu SNP. Analiza porównawcza wyników, przeprowadzona za pomocą testu t-Studenta, nie wykazała istotnych różnic między średnimi wartościami stopnia metylacji DNA wśród pacjentów z HD (n=32) i wśród osób zdrowych (n=16). Różnic tych nie zaobserwowano również w analizie metodą ANOVA, w której porównano średnie poziomy metylacji DNA w obrębie trzech grup: chorych z $(CAG)_n \leq 44$, chorych z $(CAG)_n \geq 45$ oraz grupy kontrolnej. W obu badaniach, w związku z dużą liczbą pomiarów, okazjonalnie występowały istotne statystycznie różnice pomiędzy średnim poziomem metylacji DNA w analizowanych grupach, jednak nie tworzyły one systematycznego wzoru, a także nie przekraczały 3 punktów procentowych w przypadku żadnego z badanych dinukleotydów.

Na podstawie analizy profilu metylacji genu *HTT* w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona można stwierdzić, że jest on zgodny z profilem metylacji genów, które ulegają aktywnej transkrypcji. W dalekim regionie promotorowym *HTT*, około 1500 pz w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji, stwierdzono metylację CpG na poziomie $64\% \pm 2$. W dalszych CpG w kierunku 3', zlokalizowanych w promotorze oraz w eksonie 1 genu, metylacja nie przekraczała 10%, za wyjątkiem jednego dinukleotydu (cg07624479 wg numeracji mikromacierzy Infinium), gdzie osiągała maksymalnie 19,87%. Stopień metylacji genu *HTT* w sekwencjach stanowiących tzw. *gene body* wykazywał tendencję do wzrostu w kierunku 3', ostatecznie przekraczając poziom 90% w regionie 3' UTR. Podsumowanie analizy profili metylacji genu *HTT*, pochodzących

od 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 16 zdrowych ochotników przedstawiono w tab. 21 i 22.

6.3.1. Związek pomiędzy poziomem metylacji genu *HTT* a wybranymi parametrami klinicznymi i molekularnymi choroby Huntingtona

Do badania wybrano 5 dinukleotydów CpG, w których maksymalne różnice pomiędzy stopniem metylacji DNA w grupie pacjentów przekraczały 10%. Podsumowanie wyników badania metylacji DNA w obrębie tych sekwencji przedstawiono w tab. 19.

Tab. 19. Podsumowanie wyników metylacji wybranych CgG w grupie pacjentów z HD

Lp	Numer CpG wg Infinium	Lokalizacja w genie <i>HTT</i> *	Poziom metylacji DNA			
			Średnia	SD	Min	Max
1	cg05874888	promotor	0,6459	0,0264	0,5869	0,6903
2	cg15544235	<i>gene body</i>	0,7013	0,0323	0,6280	0,7729
3	cg21121843	<i>gene body</i>	0,2678	0,0528	0,1799	0,3636
4	cg09362796	<i>gene body</i>	0,6434	0,0441	0,5671	0,7222
5	cg19280196	<i>gene body</i>	0,7493	0,0282	0,6843	0,8179

*wg bazy UCSC Genome Browser, **SD** – odchylenie standardowe, **Min** – wartość minimalna, **Max** – wartość maksymalna

6.3.1.1. Określenie zależności poziomu metylacji wybranych CpG od wieku pacjenta, jego płci, czasu trwania choroby oraz liczby CAG w zmutowanym allelu *HTT*

Analiza regresyjna nie wykazała systematycznej zależności poziomu metylacji DNA od wieku, płci, czasu trwania choroby oraz od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT*. W przypadku dinukleotydów CpG, oznaczonych numerami 1 i 2 wg tab. 19 stwierdzono marginalnie istotną zależność stopnia metylacji od wieku, jednak współczynniki determinacji R^2 były nieistotne (nie przekraczały wartości 0,2, $p > 0,05$).

6.3.1.2. Określenie zależności wieku zachorowania pacjenta od liczby powtórzeń CAG i poziomu metylacji DNA w wybranych CpG

Na podstawie jednoczynnikowego modelu regresji liniowej ustalono, że w badanej grupie (n=31) liczba CAG wyjaśnia 74,9% zmienności w wieku pojawienia się objawów klinicznych HD. Obie zmienne występowały w modelu w postaci zlogarytmizowanej.

Za pomocą wieloczynnikowych modeli regresji liniowej ustalono, że obok $(CAG)_n$, istotny statystycznie wpływ na AOO ma stopień metylacji DNA w obrębie pierwszego badanego dinukleotydu CpG (SM1), oznaczonego w mikromacierzy Infinium numerem cg05874888. Uwzględnienie w modelu stopnia metylacji CpG nr 1 (SM1) spowodowało wzrost skorygowanego R^2 o ponad 3 punkty procentowe. Należy jednak podkreślić, że przy małej grupie badanej brak normalności rozkładu reszt zakłóca wnioskowanie statystyczne. Model regresji przyjął postać:

$$\ln(AOO) = 14,75 - 2,52 \ln(CAG) - 2,44SM1.$$

Model jest istotny ($F=52,4$, $p<0,01$) i wyjaśnia 78,9% zmienności zmiennej zależnej $\ln(AOO)$. Wzrost poziomu metylacji wiąże się ze zmniejszeniem oczekiwanego wieku zachorowania pacjenta. Zmienna $\ln(CAG)_n$ jest istotna na poziomie $p<0,01$. Zmienna SM1 jest istotna na poziomie $p<0,05$. Wzrost SM1 o 0,05, przy stałym CAG, oznacza zmniejszenie oczekiwanego $\ln(AOO)$ o 0,122. Dla zmiennych niezlogarytmizowanych oznacza to zmniejszenie AOO o 11,5%. Przykładowo, przy $(CAG)_n = 43$ wartość SM1 = 0,62 daje oczekiwane AOO = 42,72 lata, a przy wzroście SM1 do 0,67 oczekiwane AOO spada do 37,81 lat. W przypadku nie uwzględnienia w modelu poziomu metylacji oczekiwany wiek zachorowania wynosi 40,56 lat. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tab. 20.

Nie potwierdzono istotnego wpływu poziomu metylacji DNA w pozostałych czterech loci na wiek zachorowania pacjentów ($p>0,05$).

Tab. 20. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(\text{AOO})$ od $\ln(\text{CAG})_n$ i poziomu metylacji DNA w dinukleotydzie CpG nr 1 (SM1). Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=31	b	SE	t	p
W. wolny	14,7586	1,1061	13,3423	<0,01
$\ln(\text{CAG})_n$	-2,5233	0,2819	-8,9509	<0,01
SM1	-2,4412	1,0556	-2,3126	0,0283
Dopasowanie modelu				
R²	0,789		F	52,41
R²_{adj}	0,774		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t; **p** – poziom istotności; **R²** – współczynnik determinacji; **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

6.3.2. Podsumowanie wyników badań mikromacierzowych

Badanie metylacji genu *HTT* za pomocą mikromacierzy Infinium nie wykazało istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami stopnia metylacji tego genu w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona i w grupie osób zdrowych. Analizy regresyjne, mające na celu określenie związku między wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi w HD a metylacją DNA, wykazały istotną zależność wieku zachorowania od poziomu metylacji dinukleotydu nr cg05874888, zlokalizowanego na brzegu wyspy CpG w promotorze genu *HTT* (ang. *CpG shore*). W przypadku pozostałych pomiarów nie zaobserwowano istotnych zależności.

Tab. 21. Podsumowanie analizy profili metylacji DNA w regionie promotorowym i w pierwszym eksonie genu *HTT*, pochodzących od 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 16 zdrowych ochotników

Lokalizacja	Region promotorowy										Ekson 1	
Numer CpG wg Infinium	cg05874888	cg18097726	cg16524332	cg07624479	cg14515049	cg27474733	cg08288806	cg03738331	cg15593398	cg08219027	cg02550322	cg22982173
SNP				rs35657303	rs11933387		rs13132932			rs396875		rs10701858
Fragment genu*	TSS1500					TSS200					Ekson 1	
Nazwa wyspy CpG*	chr4:3075483-3075773			chr4:3076186-3076558								
Lokalizacja*	brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shore</i>)**	wyspa CpG		brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shore</i>)**			wyspa CpG					
Metylacja DNA- grupa badana	0,6455	0,0087	0,0567	0,1574	0,0541	0,0102	0,0316	0,0449	0,0747	0,0130	0,0189	0,0360
Metylacja DNA- grupa kontrolna	0,6462	0,0094	0,0671	0,1749	0,0732	0,0132	0,0378	0,0507	0,0816	0,0113	0,0222	0,0358

*wg bazy UCSC Genome Browser; **ang. *CpG shore* – obejmuje sekwencje oddalone do 2 tysięcy par zasad od wysp CpG; **SNP** – sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP; **TSS** – miejsce startu transkrypcji; Poziom metylacji DNA podano jako średni odsetek zmetylowanego DNA, gdzie 0 oznacza brak metylacji, a 1- całkowitą metylację w badanym locus. Wartości do 0,1 oznaczono kolorem żółtym, od 0,11 do 0,2 kolorem pomarańczowym, a od 0,61 do 0,7 kolorem niebieskim

Tab. 22. Podsumowanie analizy profili metylacji DNA w regionie *gene body* i 3'UTR genu *HTT*, pochodzących od 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 16 zdrowych ochotników

Lokalizacja	Gen <i>HTT</i> (ang. <i>gene body</i>)											
Numer CpG wg Infinium	cg14694952	cg11324953	cg08763102	cg15544235	cg12287055	cg25880358	cg08786822	cg06383113	cg05736642	cg13877631	cg14416248	cg12636882
SNP	rs10006977	rs28656215	rs78225241			rs61460614	rs79527817					
Nazwa wyspy CpG*	chr4:3075483-3075773	chr4:3076186-3076558	chr4:3075483-3075773	chr4:3076186-3076558								
Lokalizacja*	brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shore</i>)**		brzeg wyspy CpG (ang. <i>CpG shelf</i>)***									
Metylacja DNA- grupa badana	0,0268	0,5225	0,5998	0,7015	0,8930	0,6151	0,8940	0,9127	0,8444	0,1099	0,8649	0,8693
Metylacja DNA- grupa kontrolna	0,0266	0,5111	0,5944	0,7074	0,9025	0,6106	0,8917	0,9124	0,8460	0,1129	0,8620	0,8615
Lokalizacja	Gen <i>HTT</i> (ang. <i>gene body</i>)											
Numer CpG	cg09494176	cg21121843	cg09362796	cg14967987	cg25855286	cg03654618	cg27449975	cg27404921	cg22597340	cg1323870	cg12940669	cg11858516
SNP				rs75295648	rs79322403						rs78026938	rs68049234
Metylacja DNA- grupa badana	0,8840	0,2695	0,6408	0,5263	0,8682	0,9354	0,9086	0,8963	0,8932	0,0289	0,8799	0,8887
Metylacja DNA- grupa kontrolna	0,8655	0,2685	0,6142	0,5130	0,8677	0,9318	0,9150	0,9123	0,8886	0,0284	0,8713	0,8838
Lokalizacja	Gen <i>HTT</i> (ang. <i>gene body</i>)											
Numer CpG	cg04607521	cg18319433	cg08072487	cg06839148	cg12573747	cg19280196	cg13149573	cg12122041	cg13764248	cg06609182	cg25060525	cg24709001
SNP							rs73074839		rs362272	rs71608259		
Metylacja DNA- grupa badana	0,8695	0,8099	0,9022	0,8601	0,9362	0,7475	0,9725	0,9305	0,9313	0,9051	0,8639	0,9422
Metylacja DNA- grupa kontrolna	0,8608	0,8086	0,9022	0,8476	0,9290	0,7346	0,9695	0,9270	0,9249	0,9055	0,8508	0,9358
Lokalizacja	Gen <i>HTT</i> (ang. <i>gene body</i>)							3'UTR				
Numer CpG	cg26128129	cg23728864	cg11432275	cg17988021	cg02197303	cg01542143	cg25354617	cg17898621	cg15909473	cg21625301		
SNP	rs74753713	rs73074847										
Metylacja DNA- grupa badana	0,8464	0,8009	0,8260	0,8253	0,8704	0,8287	0,8839	0,8642	0,8780	0,9139		
Metylacja DNA- grupa kontrolna	0,8178	0,7900	0,8232	0,8259	0,8576	0,8295	0,8779	0,8548	0,8733	0,9085		

*wg bazy UCSC Genome Browser; **ang. *CpG shore*- obejmuje sekwencje oddalone do 2 tysięcy par zasad od wysp CpG; ***ang. *CpG shelf*- obejmuje sekwencje oddalone do 2 tysięcy par zasad od brzegów wysp CpG (ang. *CpG shores*); SNP- sygnatura polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w bazie dbSNP. Poziom metylacji DNA podano jako średni odsetek zmetylowanego DNA, gdzie 0 oznacza brak metylacji, a 1- całkowitą metylację w badanym locus. Wartości do 0,1 oznaczono kolorem żółtym, od 0,101 do 0,3 kolorem pomarańczowym, a powyżej 0,5 odcieniami koloru niebieskiego

7. DYSKUSJA

Czynniki wpływające na wiek zachorowania oraz na tempo progresji choroby Huntingtona pozostają od lat przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Przełomem w badaniach nad dynamiką procesu neurodegeneracyjnego w HD było odkrycie podłoża molekularnego choroby w 1993 roku. Jeszcze w tym samym roku opublikowano wyniki badań, które wykazywały ujemną korelację pomiędzy wiekiem zachorowania a liczbą powtórzeń CAG, jak również na zjawisko antycypacji, obserwowane zwłaszcza gdy zmutowany allel był dziedziczony od ojca [Snell i wsp., 1993; Stine i wsp., 1993]. W kolejnych latach powstało wiele prac, których autorzy starali się wskazać, jak duży jest udział liczby powtórzeń trójnukleotydowych w zmienności przebiegu klinicznego HD, a także opracować model predykcji wieku zachorowania na podstawie wyniku badania molekularnego. Czynniki, które niewątpliwie przyczyniły się do zwiększenia rzetelności uzyskiwanych danych było wprowadzenie jednolitych skal oceny parametrów klinicznych choroby, jak również stworzenie specjalistycznych ośrodków badawczych i terapeutycznych, takich jak Huntington Study Group, The U.S.-Venezuela Collaborative Research Project, EHDN czy Enroll-HD.

Literatura dotycząca przyczyn obserwowanej zmienności w przebiegu klinicznym choroby Huntingtona obejmuje w głównej mierze badania nad obecnością wariantów polimorficznych różnych genów. W ostatnim czasie pojawiają się również doniesienia o znaczeniu cząsteczek mikroRNA czy mitochondrialnego DNA [Gusella i Macdonald, 2009; Jędrak, Krygier i wsp., 2017]. Jednakże, pomimo intensywnych poszukiwań w tym obszarze, jak dotąd nie udało się jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, dlaczego wśród nosicieli tej samej liczby powtórzeń CAG w genie *HTT* mogą występować tak duże różnice w wieku, w którym choroba ujawnia się klinicznie.

Spośród szeregu czynników genetycznych i epigenetycznych, opisanych w piśmiennictwie, jako modyfikujące przebieg chorób neurodegeneracyjnych, podjęto w niniejszej pracy doktorskiej temat metylacji DNA. Należy podkreślić, że przed rozpoczęciem badań w dostępnej literaturze brak było danych na temat metylacji genu *HTT* w chorobie Huntingtona. Co więcej, do dnia dzisiejszego nie opublikowano prac, dotyczących wpływu metylacji tego genu na przebieg choroby. Dokładna ocena

kliniczna pacjentów przez badaczy EHDN, jak również zastosowanie dwóch technik molekularnych do badania poziomu metylacji DNA, umożliwiły przeprowadzenie szczegółowej analizy, w kierunku występowania zaburzeń metylacji i ich ewentualnego związku z wybranymi parametrami klinicznymi i molekularnymi choroby Huntingtona.

7.1. Analiza wpływu wybranych czynników na wiek zachorowania (AOO, ang. *age of onset*)

Wstępem do badań molekularnych, wykonanych w ramach niniejszej pracy, była ocena wpływu wybranych zmiennych na wiek zachorowania (AOO) w grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona. Celem tej analizy było określenie, jak duży jest udział liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) w zmienności AOO w tej populacji, a także określenie udziału innych czynników, które mogłyby sugerować znaczenie metylacji DNA w patogenezie choroby.

Za pomocą modelu regresji potęgowej wykazano, że w całej populacji badanych chorych liczba powtórzeń CAG wyjaśnia 75,1% zmienności w wieku pojawienia się objawów klinicznych HD. Dla porównania, w grupie pacjentów z (CAG)_n ≤ 50 stwierdzono, że udział ten wynosi 54,3%. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi, z których wynika, że zależność AOO od (CAG)_n zależy w głównej mierze od analizowanych zakresów (CAG)_n i mieści się w przedziale od 50% do 75% [Wexler i wsp., 2004]. Szczególnie wskazane jest zatem poszukiwanie dodatkowych czynników modyfikujących w grupie chorych z krótszymi allelami, gdzie ich udział może być bardziej zauważalny niż w analizowanych grupach wszystkich chorych.

W literaturze opublikowano wiele prac, których autorzy podjęli próbę stworzenia modelu predykcji wieku zachorowania na podstawie liczby powtórzeń trójnukleotydowych w genie *HTT*. Trudności w prognozowaniu AOO wynikają z kilku czynników. Jednym z nich jest wspomniany, nierównomierny wpływ (CAG)_n na AOO, w zależności od badanych zakresów (CAG)_n. Dodatkowo, analizy regresyjne są utrudnione ze względu na brak rozkładu normalnego zmiennej (CAG)_n w populacji pacjentów z chorobą Huntingtona. Najwięcej jest bowiem chorych z liczbą powtórzeń CAG w przedziale od 40 do 50 [Wexler i wsp., 2004]. Niektórzy autorzy podejmują próbę normalizacji tej zmiennej poprzez dobór pacjentów, jednak zwykle wiąże się to z utratą

znacznej części danych [Lee i wsp., 2012]. Kolejnym istotnym elementem jest fakt, że część nosicieli mutacji w genie *HTT*, a zwłaszcza alleli o niepełnej penetracji, nie rozwija objawów choroby w ciągu życia i nie poddaje się badaniom molekularnym. Przewaga objawowych nosicieli mutacji w analizowanych grupach niesie ze sobą zatem ryzyko istotnego zawyżenia penetracji mutacji [Langbehn i wsp., 2010]. Jak wynika z przeglądu literatury, dotychczas najbardziej precyzyjnym modelem jest model parametryczny, zaproponowany przez Langbehn i wsp. [2004], który określa indywidualne prawdopodobieństwo, z jakim nosiciel danej liczby powtórzeń CAG rozwinię objawy choroby Huntingtona do określonego wieku.

Biorąc pod uwagę dominujący wpływ ekspansji powtórzeń trójnukleotydomowych na wiek, w którym nosiciele mutacji zaczynają prezentować objawy HD, w niniejszej pracy poszukiwano innych czynników modyfikujących, które mogłyby sugerować rolę zmian epigenetycznych, w tym metylacji DNA, w patogenezie choroby. Po pierwsze, określono czy płeć rodzica, od którego pacjent dziedziczy zmutowany allel, ma wpływ na rezydualną zmienność w wieku zachorowania pacjenta, niewyjaśnioną przez $(CAG)_n$. Pierwsze doniesienia o znaczeniu rodzicielskiego pochodzenia zmutowanego genu pochodzą już z 1969 roku, kiedy zaobserwowano, że w populacji chorych z postacią młodzieńczą HD dominują osoby, które odziedziczyły mutację od ojca [Merritt i wsp., 1969]. Przed odkryciem molekularnego podłoża choroby próbowano w różny sposób wyjaśnić to zjawisko, między innymi różnicami pomiędzy stopniem metylacji allela ojcowskiego i matczynego, czy też zmianą poziomu metylacji DNA wraz z wiekiem [Ridley i wsp., 1991; Farrer i wsp., 1992]. Tuż po odkryciu genu *HTT* w 1993 roku udowodniono, że antycypacja w HD jest spowodowana niestabilnością powtórzeń CAG w czasie gametogenezy, a wydłużanie nieprawidłowych powtórzeń trójnukleotydomowych występuje częściej podczas spermatogenezy [Trottier i wsp., 1994]. Dlatego też, z uwagi na częstsze występowanie dużych ekspansji trójnukleotydu CAG w potomstwie chorych mężczyzn, w grupie tej można zaobserwować wcześniejszy wiek zachorowania w porównaniu do grupy chorych, którzy odziedziczyli mutację od matki [Ranen i wsp., 1995].

Stwierdzenie istotnego wpływu płci chorego rodzica na wiek zachorowania pacjenta, po uwzględnieniu znaczenia $(CAG)_n$, mogłoby wskazywać na istnienie różnic

w ekspresji zmutowanej huntingtyny pomiędzy allelem matczynym i ojcowskim. Klasycznym przykładem specyficznej względem allelu ekspresji genu (ASE, ang. *allele-specific expression*) jest imprinting genomowy lub inaktywacja jednego z chromosomów X u kobiet. Z danych literaturowych wynika jednak, że różnice w ekspresji dwóch alleli jednego genu mogą dotyczyć nawet 20% genów. Stanowią one jedną z przyczyn zmienności osobniczej w obrębie populacji [Lo i wsp., 2003], a także odgrywają rolę w patogenezie wielu chorób [Yan i wsp., 2002]. Mechanizmy, odpowiedzialne za zjawisko ASE są złożone i obejmują przyczyny zarówno epigenetyczne, takie jak specyficzną względem allelu metylację DNA (ASM, ang. *allele-specific methylation*) oraz genetyczne, takie jak różnice w sekwencjach nukleotydowych alleli, czy w sekwencjach regulatorowych [Serre i wsp., 2008].

W niniejszej pracy nie wykazano, aby płeć chorego rodzica miała istotny wpływ na wiek zachorowania pacjenta, zarówno w grupie wszystkich chorych, jak i chorych z $(CAG)_n \leq 50$. Nie stwierdzono także występowania różnic między średnimi wartościami wieku zachorowania i liczby powtórzeń CAG wśród pacjentów, którzy odziedziczyli mutację od matki i pacjentów, którzy odziedziczyli mutację od ojca. Opublikowane w literaturze prace, w których analizowano to zjawisko, wykazują rozbieżność wyników. Stine i wsp. [1993] nie udowodnili wpływu płci chorego rodzica na AOO dziecka w grupie 114 pacjentów z HD. Ranen i wsp. [1995] zbadali 277 par rodziców i ich dzieci z chorobą Huntingtona, pod kątem różnych czynników, modyfikujących przebieg choroby. W pracy tej wykazano, że niestabilność alleli w czasie gametogenezy wzrasta wraz z liczbą CAG, a także, że antycypacja jest fenomenem obserwowanym zwłaszcza w potomstwie chorych mężczyzn. Dodatkowo, obok liczby powtórzeń CAG, wiek zachorowania, jak również płeć chorego rodzica miały istotny wpływ na wiek zachorowania dziecka. W przedstawionym modelu regresji potęgowej zmienna $(CAG)_n$ wyjaśniała 47% zmienności w AOO dziecka, zmienna AOO rodzica – kolejne 16%, natomiast płeć chorego rodzica – aż 6%. Na podstawie przeglądu literatury z kolejnych lat [Wexler i wsp., 2004; Gusella i MacDonald, 2009; Orth i Schwenke, 2011] oraz wyników niniejszej pracy doktorskiej można podejrzewać, że udział tych dodatkowych czynników jest zawyżony. Może to wynikać z ograniczeń przedstawionej pracy. Populacja zbadana przez Ranen i wsp. [1995] obejmowała w rzeczywistości jedynie 60

chorych, bowiem tylko dla takiej liczby pacjentów znana była liczba powtórzeń CAG oraz wiek zachorowania rodzica. W przypadku braku normalności rozkładu reszt zmiennych w tak małej populacji zastosowanie linearyzowanego modelu regresji mogło się zatem wiązać ze znacznym ryzykiem błędnego wnioskowania statystycznego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę to, że w pracy analizowano grupę chorych z uwzględnieniem wszystkich wartości $(CAG)_n$, czyli również dużych ekspansji trójnukleotydowych, wyjaśnienie przez tę zmienną jedynie 47% zmienności AOO wydaje się być zaniżone.

Podobnie jak w niniejszej pracy doktorskiej, wpływu imprintingu genomowego na przebieg choroby nie wykazano również w ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 2 (SCA 2, ang. *spinocerebellar ataxia*). Figueroa i wsp. [2017] zbadali czynniki, które wpływają na wiek zachorowania w grupie 329 kubańskich pacjentów z SCA2. Liczba CAG w nieprawidłowym allelu *ATXN2* wyjaśniała w tej populacji 69% zmienności w AOO, zaś w grupie chorych z $(CAG)_n$ od 32 do 40 – 38%. Zatem w chorobie tej, analogicznie do HD, zależność wieku zachorowania od liczby powtórzeń CAG jest silniejsza wśród chorych z dużymi ekspansjami trójnukleotydowymi. W badaniu nie udowodniono, aby płeć chorego rodzica, obok liczby powtórzeń CAG, miała istotny wpływ na wiek zachorowania u potomstwa. Za 33% rezydualnej zmienności w AOO odpowiadały inne czynniki dziedziczne, a odsetek ten był większy wśród rodzeństwa niż w analizowanych parach rodzic–dziecko. Autorzy tej pracy podkreślają zaskakującą zgodność uzyskanych wyników z wynikami w chorobie Huntingtona, co może sugerować występowanie recesywnych lub sprzężonych z płcią alleli, które w zbliżony sposób modyfikują przebieg obu tych schorzeń.

Zgodnie z wynikami opublikowanymi w literaturze, wykazano w niniejszej pracy istotny wpływ wieku zachorowania rodzica na wiek zachorowania wśród potomstwa. Dodanie tej zmiennej do modelu regresji spowodowało wzrost wyjaśnionej zmienności AOO o 4,2 punktów procentowych w grupie wszystkich chorych oraz o 7,5 punktów procentowych w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$. Ranen i wsp. [1995] zaproponowali uwzględnienie informacji o AOO rodzica w modelach predykcji wieku zachorowania dla nosicieli mutacji w genie *HTT*. Wyniki badań, opublikowane przez Orth i Schwenke [2011] potwierdzają, że informacja ta zwiększa zgodność AOO osza-

cowanego z rzeczywistym, jednak w pracy tej nie podano charakterystyki dopasowania modelu do danych oraz istotności zmiennych. Powyższe obserwacje sugerują, że część różnic pomiędzy wiekiem zachorowania pacjentów, które nie wynikają z liczby powtórzeń CAG, ma charakter rodzinny. Wexler i wsp. [2004], na podstawie badań wenezuelskich rodzin z HD oszacowali, że nawet 84% rezydualnej zmienności w wieku zachorowania jest rodzinna i wynika z innych niż $(CAG)_n$ czynników genetycznych i środowiskowych. Jak dotąd nie zbadano jednak, czy należą do nich różnice w stopniu metylacji DNA lub inne modyfikacje epigenetyczne.

Wyniki opublikowanych badań wskazują, że część zmienności osobniczej w poziomie metylacji DNA ma charakter dziedziczny, jednak dokładny mechanizm przekazywania wzoru metylacji DNA pomiędzy pokoleniami pozostaje nadal niewyjaśniony. Wyróżnia się dwa podstawowe typy dziedziczenia modyfikacji epigenetycznych: dziedziczenie genetyczne i dziedziczenie epigenetyczne. W pierwszym typie za zmiany w stopniu metylacji DNA odpowiadają różnice w sekwencji nukleotydów w DNA, np. wariant polimorficzny w obrębie dinukleotydu CpG lub w innych fragmentach genomu. Dziedziczenie epigenetyczne może być spowodowane np. niecałkowitą demetylacją DNA w gametach oraz w zygocie, lecz dotychczas nie wyjaśniono dokładnych mechanizmów, odpowiedzialnych za występowanie tego zjawiska u ludzi [Morgan i Whitelaw, 2008]. Badania wskazują, że za około 20% różnic osobniczych w stopniu metylacji DNA odpowiadają warianty polimorficzne, zlokalizowane poza dinukleotydami CpG [McRae i wsp., 2014]. Nie można zatem wykluczyć, że za część rezydualnej zmienności w wieku zachorowania o charakterze rodzinnym odpowiadają różnice w stopniu metylacji DNA lub inne modyfikacje epigenetyczne.

Z przeglądu dostępnej literatury wynika, że badanie wpływu wieku zachorowania rodzica na AOO pacjenta, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, obejmowało największą, jak dotąd populację chorych. Ograniczeniem tej analizy był jednak fakt, że informacja o wieku, w którym rodzic zaczął prezentować objawy HD, była uzyskiwana w ramach wywiadu rodzinnego, zbieranego od pacjenta i członków jego rodziny. Udowodniono, że najbardziej wiarygodne jest ustalanie wieku zachorowania na podstawie prospektywnej obserwacji nosiciela mutacji w genie *HTT*. Dlatego też, aby określić jak duże jest znaczenie AOO rodzica w przebiegu choroby u dziecka wskazana

byłaby wieloletnia obserwacja przynajmniej dwóch pokoleń chorych przez zespoły specjalistów. Poprzez stworzenie specjalistycznych ośrodków badawczych i terapeutycznych, takich jak Huntington Study Group, The U.S.-Venezuela Collaborative Research Project, EHDN czy Enroll-HD, przeprowadzenie takiej analizy wydaje się możliwe w perspektywie najbliższych lat.

W niniejszej pracy wykazano, że pacjenci, u których choroba Huntingtona występowała u jednego z rodziców charakteryzują się istotnie wcześniejszym wiekiem zachorowania oraz większą liczbą powtórzeń CAG w porównaniu do grupy chorych z nieobciążonym wywiadem rodzinnym. Obserwacja ta wynika z niestabilności powtórzeń CAG w czasie gametogenezy i obserwowanego w HD zjawiska antycypacji. Oznacza to, że wraz z przekazywaniem mutacji kolejnym pokoleniom może dojść do zwiększenia $(CAG)_n$, a co za tym idzie wcześniejszego pojawienia się objawów choroby u pacjenta [Semaka i wsp., 2013].

Nie można również wykluczyć, że u pacjentów z nieobciążonym wywiadem rodzinnym oszacowany wiek zachorowania jest zawyżony, albowiem stwierdzono statystycznie istotny, choć niewielki wpływ występowania choroby u rodzica na rezydualną zmienność w wieku zachorowania pacjenta, niewyjaśnioną przez $(CAG)_n$. Orth i Schwenke [2011] porównali określony przez badaczy EHDN wiek zachorowania pacjentów, włączonych do badania REGISTRY EHDN z wiekiem, który został ustalony na podstawie punktacji w skali UHDRS z przynajmniej trzech wizyt chorych, a także predykcji AOO za pomocą modeli Langbehn i wsp. [2004] i Ranen i wsp. [1995]. Wykazali oni, że retrospektywne oszacowanie wieku zachorowania przez badacza po wielu latach trwania choroby jest mniej wiarygodne niż długotrwała obserwacja progresji zaburzeń na podstawie skal EHDN. Wśród chorych, u których wywiad rodzinny w kierunku HD jest nieobciążony, rozpoznanie choroby Huntingtona jest utrudnione, a diagnostykę molekularną wdraża się zazwyczaj w pełnoobjawowej fazie choroby, po wykluczeniu nabytych przyczyn płasawicy. Dyskretne objawy choroby, charakterystyczne dla fazy prodromalnej mogą zatem zostać niezauważone, zarówno przez pacjenta jak i lekarza, a co za tym idzie oszacowany wiek zachorowania może być wyższy w porównaniu do pacjentów, u których choroba występowała u jednego z rodziców. Nie można jednak wykluczyć, że obserwowane zjawisko ma podłoże biologiczne

i wynika, np. ze zmian epigenetycznych, zachodzących podczas przekazywania potomstwu alleli o nieprawidłowej liczbie powtórzeń CAG.

7.2. Ocena metylacji genu *HTT* w chorobie Huntingtona

W ostatnich latach, po wprowadzeniu wysokoprzepustowych technik molekularnych, popularna stała się analiza genomowych profili metylacji DNA (ang. *genome-wide methylation profiling*). Przyczyniła się ona do gwałtownego wzrostu wiedzy na temat metylacji genomu, a także umożliwiła identyfikację regionów o odmiennej metylacji (DMRs, ang. *differentially methylated regions*), związanych z procesem ewolucji, starzeniem, nowotworzeniem czy rozwojem wielu chorób u człowieka. Terminem DMRs określa się sekwencje DNA, które wykazują charakterystyczny, odmienny wzorzec metylacji DNA, w zależności od tkanek z których pochodzą, populacji, stadium różnicowania komórek, procesu chorobowego, czy innych stanów. Są to zwykle fragmenty DNA o wielkości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad, a zatem obejmujące przynajmniej kilka sąsiadujących dinukleotydów CpG [Rakyan i wsp., 2011]. Jak wynika z literatury, wiele DMRs zlokalizowanych jest w proksymalnych regionach promotorowych genów, gdzie znajdują się zależne od metylacji DNA sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*). Udowodniono istnienie związku pomiędzy stopniem metylacji DNA w tych obszarach a wzorem metylacji histonów i poziomem ekspresji genu [Schmidl i wsp., 2009]. Z badań, w których analizowano genomowe profile metylacji DNA w chorobach neurodegeneracyjnych wynika, że w chorobach tych, w przeciwieństwie do nowotworów, zmiany w stopniu metylacji DNA są zwykle dyskretne [Huynh i wsp., 2014; Watson i wsp., 2016]. Ustalenie ich znaczenia funkcjonalnego może być zatem utrudnione, chociaż udowodniono, że nawet 5-10% różnice w stopniu metylacji CpG mogą istotnie wpływać na ekspresję białka [Lim i wsp., 2012].

Jednym z celów przeprowadzonej analizy było określenie, czy w chorobie Huntingtona dochodzi do zaburzeń metylacji genu *HTT*, a jeśli tak, to czy w sekwencjach sąsiadujących z mutacją dynamiczną obserwuje się charakterystyczny, nieprawidłowy wzorzec metylacji DNA, podobnie jak w niektórych chorobach, wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych. Poszukiwano w szczególności różnic

w poziomie metylacji DNA, które obejmowałyby kilka dinukleotydów CpG w jednym fragmencie genu. Badania przeprowadzono za pomocą dwóch technik molekularnych, tj. mikromacierzy metylacyjnych oraz trawienia DNA metylospecyficznym enzymem restrykcyjnym i ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (MSRE-qPCR). Obie te techniki mają swoje zalety i wady, które mogą wpływać na dokładność metody pomiaru. MSRE-qPCR jest techniką stosunkowo tanią, która pozwala na ocenę poziomu metylacji DNA w wybranych loci w przypadku nawet niewielkiej ilości materiału genetycznego [Gagnon i wsp., 2010]. Jest to jednak metoda czasochłonna i kilkietapowa, a każdy z etapów może generować wystąpienie błędu pomiaru. Niewątpliwą zaletą mikromacierzy metylacyjnych jest udowodniona wysoka odtwarzalność wyników oraz ich zgodność z wynikami, uzyskiwanymi metodą WGBS (ang. *whole-genome bisulfite sequencing*) [Bibikova i wsp., 2011]. Wadą tej metody jest jednak stosunkowo wysoki koszt, a także ryzyko częściowej degradacji materiału biologicznego, związane z konwersją DNA pod wpływem wodorosiarczyny sodu.

Podczas wykonywania analiz molekularnych metodą MSRE-qPCR, w reakcji ilościowej łańcuchowej polimerazy uzyskiwano niejednokrotnie wyższą ilość produktu z matrycy, która powinna ulec chociażby częściowemu trawieniu enzymem restrykcyjnym w obrębie badanego amplikonu, niż z DNA referencyjnego, który nie był poddany trawieniu. W dostępnej literaturze brak jest opracowań, które wyjaśniałyby mechanizm obserwowanego zjawiska. W metodach pomiaru stężenia DNA, wykorzystujących amplifikację sekwencji *Alu* w reakcji qPCR zaobserwowano jednak, że fragmentacja genomowego DNA do wielkości 1500 bp umożliwiła uzyskanie wyższego i bardziej dokładnego pomiaru stężenia DNA w porównaniu z wynikami, uzyskanymi dla matrycy nietrawionej. Autorzy pracy [Sedlackova i wsp., 2013] sugerują, że może być to wynikiem tworzenia złożonych struktur przestrzennych przez długie fragmenty dwuniciowego DNA, które w reakcji qPCR utrudniają dostęp składników mieszaniny reakcyjnej do sekwencji docelowych. Można zatem przypuszczać, że powodem otrzymywania wyższego sygnału fluorescencji dla DNA trawionego enzymem *HpaII* jest ułatwienie amplifikacji jego krótkich fragmentów względem długich fragmentów DNA referencyjnego. Drugim z potencjalnych mechanizmów jest wydłużenie etapu denaturacji matrycy nietrawionej, w porównaniu do matrycy poddanej działaniu enzy-

mu restrykcyjnego. W obu przypadkach kluczowa jest zatem różnica we fragmentacji DNA w próbkach badanych i próbkach kontrolnych.

W celu uzyskania zbliżonej długości fragmentów DNA, w niniejszej pracy próbki kontrolne poddano działaniu enzymu *HpyF30I*. Sekwencja 5'-TCGA-3', która jest trawiona przez ten enzym, nie znajdowała się w obrębie żadnego z badanych amplikonów. Wprowadzona modyfikacja spowodowała obniżenie stopnia metylacji DNA w przypadku większości badanych loci, jak również pozwoliła na wyeliminowanie wyników metylacji DNA, które przekraczały poziom 100% [Krygier i wsp., 2016].

Wyniki uzyskane techniką mikromacierzy metylacyjnych oraz MSRE-qPCR nie wskazują na występowanie zaburzeń metylacji genu *HTT* w DNA z krwi obwodowej pacjentów z chorobą Huntingtona. Wzór metylacji tego genu jest zgodny z obserwowanym wzorem metylacji innych genów aktywnych transkrypcyjnie, co oznacza, że region promotorowy charakteryzuje się brakiem lub niskim odsetkiem metylacji cytozyn, zaś w dalszych sekwencjach genu (*gene body*) stopień metylacji CpG jest wysoki. Wyniki obu metod przedstawiają zbliżony obraz metylacji genu *HTT* w badanych próbkach. Bezpośrednie ich porównywanie nie jest jednak zasadne, bowiem nie analizowały one stopnia metylacji tych samych dinukleotydów CpG w obrębie genu.

W regionie 1 *HTT* (PM1), zlokalizowanym około 1500 par zasad w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji, średni poziom metylacji DNA wśród chorych z HD, uzyskany techniką MSRE-qPCR, wynosił 56,91%. Zbliżony wynik otrzymano w badaniu mikromacierzowym dla dinukleotydu CpG (cg05874888), oddalonego o siedem par zasad w kierunku 3' od PM1, gdzie średni poziom metylacji wynosił 64,55%. Kolejnym zbadanym CpG w kierunku 3' genu był region PM2 w metodzie MSRE-qPCR, gdzie średni poziom metylacji wśród chorych wynosił 37,81%. Według bazy USCS Genome Browser obszar ten stanowi brzeg wyspy CpG (ang. *CpG island shore*).

Termin *CpG island shores* odnosi się do sekwencji DNA, oddalonych do dwóch tysięcy par zasad od wysp CpG, o nieco mniejszej zawartości dinukleotydów CpG. Regiony te są szczególnie ważne, bowiem wykazano, że metylacja na brzegach wysp charakteryzuje się zmiennością tkankową i jest ściśle związana z inaktywacją tran-

skrypcji. Co więcej, większość obserwowanych różnic tkankowych w poziomie metylacji DNA dotyczy brzegów wysp, a nie w samych wysp CpG [Portela i Esteller, 2010]. W pracy [Irizarry i wsp., 2009], w której porównano genomowy profil metylacji DNA raka jelita grubego oraz tkanek zdrowych, 76% zidentyfikowanych regionów o odmiennym poziomie metylacji DNA zlokalizowanych było w obrębie brzegów wysp, 18% w obszarach oddalonych od wysp o ponad 2 tysiące par zasad (*ang. CpG shelves*), a jedynie 6% w samych wyspach CpG.

Istnieje szereg dowodów literaturowych na to, że w obrębie wysp CpG, zlokalizowanych w regionach promotorowych genów aktywnych transkrypcyjnie, nie dochodzi do metylacji cytozyn [Jones, 2012]. W przypadku genu *HTT* znajduje to odzwierciedlenie w wynikach uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej. W badaniu techniką MSRE-qPCR nie stwierdzono metylacji DNA w regionie 3 *HTT* (PM3). Wyniki analizy mikromacierzowej wykazały, że wyspy CpG w obrębie promotora genu i eksonu pierwszego charakteryzują się brakiem lub bardzo niskim odsetkiem metylacji cytozyn (<10%), a wyższe wartości są obserwowane jedynie na ich brzegach (odpowiednio 64,55% dla cg0587488 oraz 15,74% dla cg07624479). W przeciwieństwie do zaburzeń, opisanych w zespole łamliwego chromosomu X można zatem stwierdzić, że w chorobie Huntingtona nie dochodzi do hipermetylacji promotora genu *HTT*, a granica między wysoce zmetylowanymi a niezmetyleowanymi dinukleotydami CpG nie jest utracona. Obserwacje te są zgodne z wynikami opublikowanymi w 2014 roku przez Naumann i wsp. [2014], którzy przeprowadzili badanie regionu zlokalizowanego w kierunku 5' od promotora genu *HTT* metodą sekwencjonowania DNA, poddanego działaniu wodorosiarczynu sodu (*ang. bisulfite sequencing*). Autorzy pracy wykazali istnienie granicy pomiędzy silnie zmetylowanymi a niezmetyleowanymi CpG w tym obszarze, jednak badanie przeprowadzono na DNA z krwi, pochodzącej tylko od jednego pacjenta z HD.

W niniejszej pracy, analiza mikromacierzowa sekwencji kodującej *HTT* (*ang. gene body*) wykazała wysoki poziom metylacji większości zbadanych dinukleotydów CpG. Stopień metylacji DNA wykazywał tendencję do wzrostu w kierunku 3' genu, choć w obrębie *gene body* stwierdzono również występowanie sekwencji o niskim poziomie metylacji (cg13877631 i cg1323870). Znaczenie tych obszarów w regulacji

ekspresji genów nie jest znane. Istnieje teoria, że sekwencje te są pozostałościami dawnych promotorów genów, które były wykorzystywane podczas wczesnego rozwoju embrionalnego i nie zostały poddane metylacji *de novo* (ang. *orphan promoters*) [Illingworth i wsp., 2010]. Wartości metylacji uzyskane metodą MSRE-qPCR w regionie 4 *HTT* (PM4), zlokalizowanym w obrębie sekwencji kodującej, są zgodne z wynikami mikromacierzowymi. Średni stopień metylacji DNA był bowiem w tym regionie wysoki i wynosił 78,34% w grupie pacjentów z HD.

7.3. Określenie związku pomiędzy wynikami analizy metylacji genu *HTT* a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby

Metylacja DNA była przez wiele lat uważana za modyfikację epigenetyczną, która prowadzi do wyciszenia transkrypcyjnego genu. W ostatnich latach udowodniono jednak, że bardzo istotnym czynnikiem, determinującym jej wpływ na ekspresję białka, jest lokalizacja w obrębie genomu. Z danych literaturowych wynika, że metylacja wysp CpG w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc startu transkrypcji prowadzi do zahamowania inicjacji transkrypcji. Z drugiej strony, sekwencje kodujące genów, które są ubogie w wyspy CpG, wykazują wysoki stopień metylacji, który jest dodatnio skorelowany z poziomem ekspresji białka. Metylacja CpG hamuje zatem inicjację transkrypcji, jednocześnie wspierając proces elongacji [Jones, 2012]. Opisane mechanizmy są poparte szeregiem dowodów literaturowych, jednak znaczenie metylacji DNA w innych fragmentach genów, jak również w obszarach międzygenowych, pozostaje nadal niewyjaśnione. W badaniach wykazano, że granice pomiędzy eksonami i intronami charakteryzują się zmiennym poziomem metylacji DNA, który może odpowiadać za regulację procesu składania RNA [Laurent i wsp., 2010]. Udowodniono również, że metylacja CpG w obrębie sekwencji wzmacniających (ang. *enhancers*), zlokalizowanych w różnych odległościach od promotorów genów, prowadzi do obniżenia ich aktywności, związanej ze wspomaganie procesu transkrypcji. Powyższe obserwacje wskazują, że metylacja DNA jest mechanizmem bardzo złożonym i może mieć znaczenie w regulacji ekspresji genów zarówno, gdy zlokalizowana jest w obrębie regionów promotorowych, jak i w sekwencjach kodujących genów czy w obszarach międzygenowych [Jones, 2012].

Spośród chorób, wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych, w ataksji Friedreicha oraz w zespole łamliwego chromosomu X wykazano istotną zależność między przebiegiem klinicznym a metylacją DNA w sekwencjach sąsiadujących z mutacją dynamiczną [Evans-Galea i wsp., 2012; Tassone i wsp., 2000]. Patogeneza tych chorób związana jest jednak z obniżeniem ekspresji białka, a nie z jego akumulacją, jak w przypadku choroby Huntingtona. Biorąc pod uwagę choroby poliglutaminowe, o zbliżonym patomechanizmie do HD, związek ten określono m.in. w ataksjach rdzeniowo-mózdkowych typu 2 i 3 (SCA, ang. *spinocerebellar ataxia*). W SCA 2 wykazano, że hipermetylacja CpG w pobliżu miejsca startu transkrypcji w genie *ATXN2* wiązała się z późniejszym początkiem objawów choroby i łagodniejszym przebiegiem klinicznym, w porównaniu do chorych z hipometylacją DNA w tym obszarze [Laffita-Mesa i wsp., 2012]. W pracy, opublikowanej przez Emmel i wsp. [2010] nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności wieku zachorowania w SCA3 od stopnia metylacji sześciu wybranych dinukleotydów CpG, zlokalizowanych w regionie promotorowym genu ataksyny 3. Najnowsze wyniki, opublikowane przez Wang i wsp. [2017] wskazują jednak, że u pacjentów z SCA3 dochodzi do hipermetylacji CpG w promotorze genu *ATXN3*. Ponadto w pracy tej wykazano, że wzrost poziomu metylacji DNA w obrębie promotora koreluje z niestabilnością liczby powtórzeń CAG podczas przekazywania mutacji potomstwu, a także z wcześniejszym wiekiem zachorowania.

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę związku pomiędzy stopniem metylacji DNA genu *HTT* a przebiegiem klinicznym choroby Huntingtona za pomocą jedno- i wieloczynnikowych modeli regresji liniowej. W regresji wielorakiej zastosowano technikę eliminacji wstecznej, która umożliwiła stworzenie optymalnego modelu, poprzez eliminację kolejnych zmiennych na podstawie wartości skorygowanego współczynnika R^2 . Zastosowanie technik liniowych do oceny zjawisk biologicznych ma swoje zalety i wady. Jest to metoda często stosowana w literaturze, bowiem budowa, interpretacja i wykorzystanie modeli liniowych jest szczególnie łatwe i wygodne. Należy jednak pamiętać, że wszystkie złożone zjawiska biologiczne są w mniejszym lub większym stopniu nieliniowe, a przedstawione modele przedstawiają jedynie generalną tendencję w zbiorze danych.

W przypadku wyników badania metylacji DNA, uzyskanych techniką MSRE-qPCR, nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności stopnia metylacji CpG od wybranych parametrów. W modelach, w których analizowano czynniki wpływające na punktację w skalach zaawansowania zaburzeń ruchowych oraz zaburzeń funkcjonowania, istotnymi zmiennymi były wiek oraz liczba powtórzeń CAG. Wyniki te są zgodne z wynikami Rosenblatt i wsp. [2011], którzy obserwowali stopień progresji choroby Huntingtona przez średnio osiem lat. W pracy tej wykazano istotne znaczenie wieku pacjenta podczas pierwszej wizyty oraz liczby powtórzeń CAG w nieprawidłowym alelu *HTT* w progresji HD.

W przeciwieństwie do niekwestionowanego wpływu liczby powtórzeń CAG na wiek, w którym u pacjentów pojawiają się pierwsze objawy HD, jej znaczenie w dalszym przebiegu choroby pozostaje niejednoznaczne. W części prac nie wykazano istotnego wpływu $(CAG)_n$ na progresję HD, z kolei w innych opracowaniach zależność ta była słaba i nie dotyczyła wszystkich parametrów klinicznych [Brandt i wsp., 1998; Marder i wsp., 2000]. Na podstawie wyników badań z kolejnych lat można przypuszczać, że przyczyną tych rozbieżności było nakładanie się naturalnego procesu starzenia organizmu z procesem neurozwyrodnieniowym, wywołanym chorobą. Ravina i wsp. [2008] oraz Rosenblatt i wsp. [2011] udowodnili, że istotność wpływu liczby powtórzeń CAG na stopień progresji HD występuje jedynie w modelach, skorygowanych o wiek pacjenta w dniu badania. Korelacja ta ma charakter dodatni, to znaczy im więcej jest powtórzeń CAG tym przebieg choroby jest cięższy. Zależność od $(CAG)_n$ dotyczy w różnym stopniu poszczególnych zaburzeń ruchowych i poznawczych, natomiast nie jest obserwowana w przypadku objawów psychiatrycznych i behawioralnych.

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza związku pomiędzy wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi HD a wynikami mikromacierzowymi, wykazała istotną statystycznie zależność wieku zachorowania od poziomu metylacji dinukleotydu nr cg05874888, zlokalizowanego na brzegu wyspy CpG w promotorze genu (*ang. CpG shore*). Średni poziom metylacji DNA w tym regionie wynosił 64,59%, a wzrost metylacji wiązał się ze zmniejszeniem oczekiwanego wieku zachorowania pacjenta. Należy jednak zaznaczyć, że z uwagi na małą liczbę badanych chorych ($n=31$) oraz brak normalności rozkładu reszt w modelu regresji, analiza ta była obciążona

znacznym ryzykiem wystąpienia błędu. Chociaż zwiększenie stopnia metylacji DNA w promotorze *HTT* powinno skutkować obniżeniem ekspresji zmutowanej huntingtyny, a co za tym idzie wolniejszym procesem neurozwyrodnieniowym wydaje się, że względu na złożone interakcje między elementami maszynerii epigenetycznej takie wnioskowanie byłoby zbyt dużym uproszczeniem. Zwłaszcza w świetle wyników, opublikowanych przez Wang i wsp. [2017], którzy wykazali, że hipermetylacja CpG w obrębie promotora genu ataksyny 3 koreluje z wcześniejszym wiekiem zachorowania pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3. Nie można bowiem wykluczyć, że dinukleotydy, który ulega hipermetylacji znajduje się w obrębie sekwencji wspomagającej i regulującej transkrypcję genu (ang. *enhancer*). Co więcej, w badaniach nad chorobami poliglutaminowymi udowodniono, że zarówno metylacja DNA jak i inne modyfikacje epigenetyczne mogą ulegać zmianom pod wpływem akumulacji toksycznego produktu białkowego, co w dalszym stopniu zwiększa złożoność tych interakcji [Ng i wsp., 2013].

W literaturze podkreśla się, że zmiany w stopniu metylacji DNA (DMRs, ang. *differentially methylated regions*), które mają znaczenie funkcjonalne, obejmują zwykle od kilkuset do kilku tysięcy par zasad, a zatem przynajmniej kilka sąsiadujących CpG [Rakyan i wsp., 2008]. Za pomocą techniki MSRE-qPCR zbadano stopień metylacji dwóch dinukleotydów CpG, które znajdowały się w bliskim sąsiedztwie cg05874888, w obrębie brzegu tej samej wyspy CpG. Regiony PM1 i PM2 były oddalone od cg05874888 o odpowiednio siedem i 199 par zasad w kierunku 3' genu. Analiza regresyjna nie wykazała istotnej zależności wieku zachorowania od stopnia metylacji DNA tych sekwencji. Nie udało się zatem potwierdzić na większej grupie chorych, aby stopień metylacji DNA w obrębie analizowanego fragmentu promotora genu wpływał istotnie na wiek zachorowania w HD. Obserwacje te nie pozwalają jednak na całkowite wykluczenie udziału metylacji DNA w obrębie cg05874888 w przebiegu HD, bowiem opublikowano prace, w których wykazano istotny wpływ zmian w metylacji pojedynczego CpG na ekspresję białka [Xu i wsp., 2007]. W celu weryfikacji tej hipotezy wskazane byłoby zbadanie stopnia metylacji tej sekwencji w większej grupie chorych, np. techniką pirosekwencjonowania. Nie jest ona bowiem rozpoznawana przez enzymy restrykcyjne, które zastosowano w badaniu MSRE-qPCR.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej nie wykazano zaburzeń metylacji genu *HTT* w materiale, pochodzącym z krwi obwodowej pacjentów z chorobą Huntingtona. Nie stwierdzono również istnienia związku pomiędzy wynikami stopnia metylacji CpG tego genu a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. Pomimo, iż analiza wyników mikromacierzowych wykazała istotną statystycznie zależność wieku zachorowania od poziomu metylacji jednego z badanych dinukleotydów CpG, potwierdzenie tego związku wymagałoby przeprowadzenia badań na większej grupie chorych, a także określenia wpływu metylacji CpG na stopień ekspresji zmutowanej huntingtyny,

Należy podkreślić, że przedstawione wyniki nie wykluczają wpływu metylacji genu *HTT* na przebieg choroby Huntingtona. Wynika to z ograniczeń niniejszej pracy doktorskiej. Pomimo, iż stopień metylacji określono dla łącznie 62 dinukleotydów CpG, rozproszonych po całym genie, nie można wykluczyć występowania zmian w jego innych, niebadanych fragmentach. Co więcej, nie analizowano metylacji innych niż cytozyna zasad azotowych. Co prawda 5-metylocytozyna stanowi najczęstszą modyfikację epigenetyczną, ostatnie doniesienia wskazują na potencjalne znaczenie chemicznej modyfikacji innych zasad azotowych w regulacji ekspresji genów [Mondo i wsp., 2017].

Materiałem do analiz molekularnych była w niniejszej pracy krew obwodowa pacjentów. Wiadome jest jednak, że przeciwieństwie do kodu genetycznego, uniwersalnego dla wszystkich komórek organizmu, informacja epigenetyczna charakteryzuje się dużą różnorodnością tkankową i zmiennością w czasie. Zaburzenia metylacji DNA w chorobie Huntingtona wykazano, jak dotąd w neuronach prądkowia i kory mózgowej myszy transgenicznych z HD [Ng i wsp., 2013]. Tkankowo-specyficzne zmiany w poziomie metylacji DNA zostały stwierdzone także w innych chorobach neurodegeneracyjnych. W chorobie Alzheimera stwierdzono obecność licznych regionów o odmiennym poziomie metylacji DNA (DMRs) w materiale autopsyjnym, pochodzącym z zakrętów skroniowych górnych [Watson i wsp., 2016]. W mózgach pacjentów z dziedziczną postacią stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), spowodowaną ekspansją heksanukleotydu GGGGCC w genie *C9orf72*, wykazano hipermetylację dinukleotydów CpG w regionie promotorowym genu. Wzrost

stopnia metylacji cytozyn wiązał się z łagodniejszym przebiegiem klinicznym ALS, prawdopodobnie na skutek obniżenia ekspresji toksycznego produktu białkowego [Esanov i wsp., 2016]. Nie można zatem wykluczyć, że w chorobie Huntingtona dochodzi do tkankowo-specyficznych zaburzeń metylacji genu *HTT*, które wpływają na zmiany w ekspresji zmutowanej huntingtyny w obrębie zajętych tkanek. Różnice w somatycznej ekspresji białka mogą wpływać na dynamikę procesu neurodegeneracyjnego i w konsekwencji na wiek, w którym choroba ujawnia się klinicznie. Zaburzenia metylacji DNA w tkance nerwowej mogą być jednym z potencjalnych mechanizmów somatycznej niestabilności nieprawidłowego allela *HTT*, którą wykazano w mózgowiu pacjentów z HD [Swami i wsp., 2009]. W celu weryfikacji powyższych hipotez wskazane byłoby przeprowadzenie analizy metylacji genu *HTT* w materiale autopsyjnym, pochodzącym z tkanki mózgowej, która ulega w największym stopniu degeneracji w przebiegu choroby. W przypadku wykrycia zaburzeń metylacji *HTT*, niezbędna byłaby również ocena wpływu tej modyfikacji epigenetycznej na stopień ekspresji zmutowanej huntingtyny.

8. WNIOSKI

1. W badanej grupie polskich pacjentów z chorobą Huntingtona (HD) liczba powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) wyjaśnia znaczną część zmienności w wieku zachorowania (AOO). Odsetek wyjaśnionej przez (CAG)_n zmienności AOO jest zbliżony do wyników znanych z literatury, zarówno w grupie wszystkich chorych, jak i chorych z (CAG)_n ≤ 50.
2. Imprinting genomowy wydaje się nie mieć znaczenia w patogenezie choroby Huntingtona, gdyż nie zaobserwowano, aby obok wpływu liczby powtórzeń CAG, płeć rodzica, od którego pacjent dziedziczy zmutowany allel, miała istotny wpływ na wiek zachorowania pacjenta.
3. Należy przypuszczać, że część obserwowanych różnic w AOO, które nie wynikają z liczby powtórzeń CAG, ma charakter rodzinny, gdyż stwierdzono statystycznie istotną zależność wieku zachorowania pacjenta od AOO rodzica. W celu wyjaśnienia, czy różnice w stopniu metylacji DNA lub inne modyfikacje epigenetyczne odpowiadają za część rezydualnej zmienności w wieku zachorowania o charakterze rodzinnym wymagane są dalsze badania.
4. Nie wykazano występowania zaburzeń metylacji genu *HTT* w DNA, wyizolowanym z krwi obwodowej pacjentów z chorobą Huntingtona, a także nie wykazano związku pomiędzy stopniem metylacji tego genu a wybranymi parametrami molekularnymi i klinicznymi choroby. Parametry te obejmowały: wiek pacjenta, jego płeć, czas trwania choroby, liczbę powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* oraz punktację w skalach zaawansowania zaburzeń ruchowych i zaburzeń funkcjonowania.
5. Analiza zależności wieku zachorowania w HD od stopnia metylacji genu *HTT* wykazała istotną statystycznie zależność jedynie dla dinukleotydu nr cg05874888 w mikromacierzy Infinium (Illumina), zlokalizowanego na brzegu wyspy CpG w promotorze *HTT* (ang. *CpG shore*). Z uwagi na małą liczbę analizowanych chorych, potwierdzenie istnienia takiego związku wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

6. Opracowana modyfikacja protokołu badawczego metody MSRE-qPCR umożliwia bardziej precyzyjny pomiar ilościowy produktów w reakcji qPCR, poprzez uzyskanie zbliżonego stopnia fragmentacji próbek DNA badanego i referencyjnego.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D. & Pook, M. (2008) The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet*, 17(5), 735-46.
2. Almeida, S., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Januário, C., Rego, A. C. & Oliveira, C. R. (2008) Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 374(4), 599-603.
3. Anderson, K. E. & Marder, K. S. (2001) An overview of psychiatric symptoms in Huntington's disease. *Curr Psychiatry Rep*, 3(5), 379-88.
4. Bai, G., Cheung, I., Shulha, H. P., Coelho, J. E., Li, P., Dong, X., Jakovcevski, M., Wang, Y., Grigorenko, A., Jiang, Y., Hoss, A., Patel, K., Zheng, M., Rogaev, E., Myers, R. H., Weng, Z., Akbarian, S. & Chen, J. F. (2015) Epigenetic dysregulation of hairy and enhancer of split 4 (HES4) is associated with striatal degeneration in postmortem Huntington brains. *Hum Mol Genet*, 24(5), 1441-56.
5. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384(6610), 641-3.
6. Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J. & Tabrizi, S. J. (2015) Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15005.
7. Bauer, P. O., Zumrova, A., Matoska, V., Mitsui, K. & Goetz, P. (2004) Can ataxin-2 be down-regulated by allele-specific de novo DNA methylation in SCA2 patients? *Med Hypotheses*, 63(6), 1018-23.
8. Berger, S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447(7143), 407-12.
9. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J. B. & Shen, R. (2011) High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288-95.
10. Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. & Patel, P. I. (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet*, 62(1), 111-21.

11. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1), 6-21.
12. Bird, A. P. & Southern, E. M. (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol*, 118(1), 27-47.
13. Bogdanović, O. & Veenstra, G. J. (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5), 549-65.
14. Bonelli, R. M. & Wenning, G. K. (2006) Pharmacological management of Huntington's disease: an evidence-based review. *Curr Pharm Des*, 12(21), 2701-20.
15. Brandt, J., Bylsma, F. W., Gross, R., Stine, O. C., Ranen, N. & Ross, C. A. (1996) Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Neurology*, 46(2), 527-31.
16. Cedar, H. & Bergman, Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 10(5), 295-304.
17. Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. & Frommer, M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 22(15), 2990-7.
18. Genetic Modifiers of Huntington's Disease (GeM-HD) Consortium. (2015) Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*, 162(3), 516-26.
19. de Mezer, M., Wojciechowska, M., Napierala, M., Sobczak, K. & Krzyzosiak, W. J. (2011) Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 39(9), 3852-63.
20. Djoussé, L., Knowlton, B., Hayden, M., Almqvist, E. W., Brinkman, R., Ross, C., Margolis, R., Rosenblatt, A., Durr, A., Dode, C., Morrison, P. J., Novelletto, A., Frontali, M., Trent, R. J., McCusker, E., Gómez-Tortosa, E., Mayo, D., Jones, R., Zanko, A., Nance, M., Abramson, R., Suchowersky, O., Paulsen, J., Harrison, M., Yang, Q., Cupples, L. A., Gusella, J. F., MacDonald, M. E. & Myers, R. H. (2003) Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am J Med Genet A*, 119A(3), 279-82.
21. Dulac, C. (2010) Brain function and chromatin plasticity. *Nature*, 465(7299), 728-35.
22. Eden, S., Hashimshony, T., Keshet, I., Cedar, H. & Thorne, A. W. (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature*, 394(6696), 842.

23. Emmel, V. E., Alonso, I., Jardim, L. B., Saraiva-Pereira, M. L. & Sequeiros, J. (2011) Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients? *Clin Genet*, 79(1), 100-2.
24. Erickson, R. P. (1985) Chromosomal imprinting and the parent transmission specific variation in expressivity of Huntington disease. *Am J Hum Genet*, 37(4), 827-9.
25. Esanov, R., Belle, K. C., van Blitterswijk, M., Belzil, V. V., Rademakers, R., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Boylan, K. B., Dykxhoorn, D. M., Wu, J., Benatar, M., Wahlestedt, C. & Zeier, Z. (2016) C9orf72 promoter hypermethylation is reduced while hydroxymethylation is acquired during reprogramming of ALS patient cells. *Exp Neurol*, 277, 171-7.
26. Evans-Galea, M. V., Carrodus, N., Rowley, S. M., Corben, L. A., Tai, G., Saffery, R., Galati, J. C., Wong, N. C., Craig, J. M., Lynch, D. R., Regner, S. R., Brocht, A. F., Perlman, S. L., Bushara, K. O., Gomez, C. M., Wilmot, G. R., Li, L., Varley, E., Delatycki, M. B. & Sarsero, J. P. (2012) FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann Neurol*, 71(4), 487-97.
27. Falush, D., Almqvist, E. W., Brinkmann, R. R., Iwasa, Y. & Hayden, M. R. (2001) Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am J Hum Genet*, 68(2), 373-85.
28. Faraway, J. J. (2002) Practical Regression and Anova using R. *University of Bath*, 104, 108-109.
29. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Kiely, D. K., Conneally, P. M. & Myers, R. H. (1992) Inverse relationship between age at onset of Huntington disease and paternal age suggests involvement of genetic imprinting. *Am J Hum Genet*, 50(3), 528-35.
30. Figueroa, K. P., Coon, H., Santos, N., Velazquez, L., Mederos, L. A. & Pulst, S. M. (2017) Genetic analysis of age at onset variation in spinocerebellar ataxia type 2. *Neurol Genet*, 3(3), e155.
31. Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R. & Kouzarides, T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 31(9), 2305-12.
32. Gagnon, J. F., Sanschagrin, F., Jacob, S., Tremblay, A. A., Provencher, L., Robert, J., Morin, C. & Diorio, C. (2010) Quantitative DNA methylation analysis of laser capture microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Exp Mol Pathol*, 88(1), 184-9.

33. Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2), 261-82.
34. Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S. & Saudou, F. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118(1), 127-38.
35. Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., Dietrich, P., Volvert, M. L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L. & Humbert, S. (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron*, 67(3), 392-406.
36. Gonzalez-Alegre, P. & Afifi, A. K. (2006) Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) Huntington disease: report of 12 patients and review of the literature. *J Child Neurol*, 21(3), 223-9.
37. Gusella, J. F. & MacDonald, M. E. (2009) Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Med*, 1(8), 80.
38. Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R. & Sakaguchi, A. Y. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234-8.
39. Hadzi, T. C., Hendricks, A. E., Latourelle, J. C., Lunetta, K. L., Cupples, L. A., Gillis, T., Mysore, J. S., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Myers, R. H. & Vonsattel, J. P. (2012) Assessment of cortical and striatal involvement in 523 Huntington disease brains. *Neurology*, 79(16), 1708-15.
40. Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M. & Cedar, H. (2003) The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet*, 34(2), 187-92.
41. Ho, L. & Crabtree, G. R. (2010) Chromatin remodelling during development. *Nature*, 463(7280), 474-84.
42. Hogarth, P., Kayson, E., Kieburz, K., Marder, K., Oakes, D., Rosas, D., Shoulson, I., Wexler, N. S., Young, A. B. & Zhao, H. (2005) Interrater agreement in the assessment of motor manifestations of Huntington's disease. *Mov Disord*, 20(3), 293-7.
43. Hoogeveen, A. T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K. E., Roos, R. A., van Ommen, G. J. & Galjaard, H. (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet*, 2(12), 2069-73.

44. Huntington Study Group (1996) Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and-Consistency. *Mov Disord*, 11(2), 136-42.
45. Huynh, J. L., Garg, P., Thin, T. H., Yoo, S., Dutta, R., Trapp, B. D., Haroutunian, V., Zhu, J., Donovan, M. J., Sharp, A. J. & Casaccia, P. (2014) Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat Neurosci*, 17(1), 121-30.
46. Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R., James, K. D., Turner, D. J., Smith, C., Harrison, D. J., Andrews, R. & Bird, A. P. (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*, 6(9), e1001134.
47. Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyan, S. & Feinberg, A. P. (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*, 41(2), 178-86.
48. Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. & Wolffe, A. P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 19(2), 187-91.
49. Julien, C. L., Thompson, J. C., Wild, S., Yardumian, P., Snowden, J. S., Turner, G. & Craufurd, D. (2007) Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(9), 939-43.
50. Jędrak, P., Krygier, M., Tońska, K., Drozd, M., Kaliszewska, M., Bartnik, E., Sołtan, W., Sitek, E. J., Stanisławska-Sachadyn, A., Limon, J., Sławek, J., Węgrzyn, G. & Barańska, S. (2017) Mitochondrial DNA levels in Huntington disease leukocytes and dermal fibroblasts. *Metab Brain Dis*. [Epub ahead of print]
51. Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H. & Razin, A. (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 6(5), 705-14.
52. Kegel, K. B., Meloni, A. R., Yi, Y., Kim, Y. J., Doyle, E., Cuiffo, B. G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z. H., Chen, J. D., Nevins, J. R., Aronin, N. & DiFiglia, M. (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem*, 277(9), 7466-76.
53. Kim, M. (2013) Beta conformation of polyglutamine track revealed by a crystal structure of Huntingtin N-terminal region with insertion of three histidine residues. *Prion*, 7(3), 221-8.

54. Krygier, M., Podolak-Popinigis, J., Limon, J., Sachadyn, P. & Stanisławska-Sachadyn, A. (2016) A simple modification to improve the accuracy of methylation-sensitive restriction enzyme quantitative polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 500, 88-90.
55. Laffita-Mesa, J. M., Bauer, P. O., Kourí, V., Peña Serrano, L., Roskams, J., Almaguer Gotay, D., Montes Brown, J. C., Martínez Rodríguez, P. A., González-Zaldívar, Y., Almaguer Mederos, L., Cuello-Almarales, D. & Aguiar Santiago, J. (2012) Epigenetics DNA methylation in the core ataxin-2 gene promoter: novel physiological and pathological implications. *Hum Genet*, 131(4), 625-38.
56. Langbehn, D. R., Brinkman, R. R., Falush, D., Paulsen, J. S., Hayden, M. R. & International Huntington's Disease Collaborative Group (2004) A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet*, 65(4), 267-77.
57. Langbehn, D. R., Hayden, M. R., Paulsen, J. S. & the PREDICT-HD Investigators of the Huntington Study Group (2010) CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(2), 397-408.
58. Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsirigos, A., Ong, C. T., Low, H. M., Kin Sung, K. W., Rigoutsos, I., Loring, J. & Wei, C. L. (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 20(3), 320-31.
59. Lee, J., Hwang, Y. J., Kim, K. Y., Kowall, N. W. & Ryu, H. (2013) Epigenetic mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurotherapeutics*, 10(4), 664-76.
60. Lee, J. M., Ramos, E. M., Lee, J. H., Gillis, T., Mysore, J. S., Hayden, M. R., Warby, S. C., Morrison, P., Nance, M., Ross, C. A., Margolis, R. L., Squitieri, F., Orbelli, S., Di Donato, S., Gomez-Tortosa, E., Ayuso, C., Suchowersky, O., Trent, R. J., McCusker, E., Novelletto, A., Frontali, M., Jones, R., Ashizawa, T., Frank, S., Saint-Hilaire, M. H., Hersch, S. M., Rosas, H. D., Lucente, D., Harrison, M. B., Zanko, A., Abramson, R. K., Marder, K., Sequeiros, J., Paulsen, J. S., Landwehrmeyer, G. B., Myers, R. H., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., PREDICT-HD study of the Huntington Study Group (HSG), REGISTRY study of the European Huntington's Disease Network, HD-MAPS Study Group, COHORT study of the HSG (2012) CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, 78(10), 690-5.
61. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-26.

62. Li, L. B., Yu, Z., Teng, X. & Bonini, N. M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, 453(7198), 1107-11.
63. Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L. & Ranen, N. G. (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, 11(5), 985-93.
64. Lim, A. L., Ng, S., Leow, S. C., Choo, R., Ito, M., Chan, Y. H., Goh, S. K., Tng, E., Kwek, K., Chong, Y. S., Gluckman, P. D. & Ferguson-Smith, A. C. (2012) Epigenetic state and expression of imprinted genes in umbilical cord correlates with growth parameters in human pregnancy. *J Med Genet*, 49(11), 689-97.
65. Lo, H. S., Wang, Z., Hu, Y., Yang, H. H., Gere, S., Buetow, K. H. & Lee, M. P. (2003) Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res*, 13(8), 1855-62.
66. Luedi, P. P., Dietrich, F. S., Weidman, J. R., Bosko, J. M., Jirtle, R. L. & Hartemink, A. J. (2007) Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res*, 17(12), 1723-30.
67. Luthi-Carter, R., Hanson, S. A., Strand, A. D., Bergstrom, D. A., Chun, W., Peters, N. L., Woods, A. M., Chan, E. Y., Kooperberg, C., Krainc, D., Young, A. B., Tapscott, S. J. & Olson, J. M. (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet*, 11(17), 1911-26.
68. López Castel, A., Nakamori, M., Tomé, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C. A. & Pearson, C. E. (2011) Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet*, 20(1), 1-15.
69. Majchrzak, A., Baer-Dubowska, W. (2009) Markery epigenetyczne w diagnostyce: Metody oceny metylacji DNA. *J Lab Diagn*, 45(2), 167-173.
70. Marder, K., Zhao, H., Myers, R. H., Cudkowicz, M., Kayson, E., Kiebertz, K., Orme, C., Paulsen, J., Penney, J. B., Siemers, E. & Shoulson, I. (2000) Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology*, 54(2), 452-8.
71. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 1, R17-29.
72. McRae, A. F., Powell, J. E., Henders, A. K., Bowdler, L., Hemani, G., Shah, S., Painter, J. N., Martin, N. G., Visscher, P. M. & Montgomery, G. W. (2014) Contri-

- bution of genetic variation to transgenerational inheritance of DNA methylation. *Genome Biol*, 15(5), R73.
73. Merritt, A. D., Connelly, P. M., Rahman, N. F., and Drew, A. L. (1969) Juvenile-Huntington's chorea. *Progress in Neurogenetics*, 1, 645-650.
 74. Mondo, S. J., Dannebaum, R. O., Kuo, R. C., Louie, K. B., Bewick, A. J., LaButti, K., Haridas, S., Kuo, A., Salamov, A., Ahrendt, S. R., Lau, R., Bowen, B. P., Lipzen, A., Sullivan, W., Andreopoulos, B. B., Clum, A., Lindquist, E., Daum, C., Northen, T. R., Kunde-Ramamoorthy, G., Schmitz, R. J., Gryganskyi, A., Culley, D., Magnusson, J., James, T. Y., O'Malley, M. A., Stajich, J. E., Spatafora, J. W., Visel, A. & Grigoriev, I. V. (2017) Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi. *Nat Genet*, 49(6), 964-968.
 75. Morgan, D. K. & Whitelaw, E. (2008) The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Mamm Genome*, 19(6), 394-7.
 76. Nance, M. A. & Myers, R. H. (2001) Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7(3), 153-7.
 77. Naumann, A., Hochstein, N., Weber, S., Fanning, E. & Doerfler, W. (2009) A distinct DNA-methylation boundary in the 5'- upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, 85(5), 606-16.
 78. Ng, C. W., Yildirim, F., Yap, Y. S., Dalin, S., Matthews, B. J., Velez, P. J., Labadorf, A., Housman, D. E. & Fraenkel, E. (2013) Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(6), 2354-9.
 79. Nucifora, F. C., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V. L., Dawson, T. M. & Ross, C. A. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, 291(5512), 2423-8.
 80. Orth, M. & Schwenke, C. (2011) Age-at-onset in Huntington disease. *PLoS Curr*, 3, RRN1258.
 81. Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. & Greenamyre, J. T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*, 5(8), 731-6.
 82. Paulsen, J. S., Hoth, K. F., Nehl, C. & Stierman, L. (2005) Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. *Am J Psychiatry*, 162(4), 725-31.

83. Pieretti, M., Zhang, F. P., Fu, Y. H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T. & Nelson, D. L. (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66(4), 817-22.
84. Portela, A. & Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, 28(10), 1057-68.
85. Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T. & Jette, N. (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 27(9), 1083-91.
86. Rakyan, V. K., Down, T. A., Balding, D. J. & Beck, S. (2011) Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*, 12(8), 529-41.
87. Rakyan, V. K., Down, T. A., Thorne, N. P., Flicek, P., Kulesha, E., Gräf, S., Tomazou, E. M., Bäckdahl, L., Johnson, N., Herberth, M., Howe, K. L., Jackson, D. K., Miretti, M. M., Fiegler, H., Marioni, J. C., Birney, E., Hubbard, T. J., Carter, N. P., Tavaré, S. & Beck, S. (2008) An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Res*, 18(9), 1518-29.
88. Ralser, M., Nonhoff, U., Albrecht, M., Lengauer, T., Wanker, E. E., Lehrach, H. & Krobitsch, S. (2005) Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. *Hum Mol Genet*, 14(19), 2893-909.
89. Ranen, N. G., Stine, O. C., Abbott, M. H., Sherr, M., Codori, A. M., Franz, M. L., Chao, N. I., Chung, A. S., Pleasant, N. & Callahan, C. (1995) Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet*, 57(3), 593-602.
90. Ravina, B., Romer, M., Constantinescu, R., Biglan, K., Brocht, A., Kiebertz, K., Shoulson, I. & McDermott, M. P. (2008) The relationship between CAG repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord*, 23(9), 1223-7.
91. Ridley, R. M., Frith, C. D., Farrer, L. A. & Conneally, P. M. (1991) Patterns of inheritance of the symptoms of Huntington's disease suggestive of an effect of genomic imprinting. *J Med Genet*, 28(4), 224-31.
92. Rosenblatt, A., Brinkman, R. R., Liang, K. Y., Almqvist, E. W., Margolis, R. L., Huang, C. Y., Sherr, M., Franz, M. L., Abbott, M. H., Hayden, M. R. & Ross, C. A. (2001) Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. *Am J Med Genet*, 105(5), 399-403.

93. Rosenblatt, A., Kumar, B. V., Mo, A., Welsh, C. S., Margolis, R. L. & Ross, C. A. (2012) Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease. *Mov Disord*, 27(2), 272-6.
94. Ross, C. A., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., Scahill, R. I., Leavitt, B. R., Stout, J. C., Paulsen, J. S., Reilmann, R., Unschuld, P. G., Wexler, A., Margolis, R. L. & Tabrizi, S. J. (2014) Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol*, 10(4), 204-16.
95. Ryu, H., Lee, J., Hagerty, S. W., Soh, B. Y., McAlpin, S. E., Cormier, K. A., Smith, K. M. & Ferrante, R. J. (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(50), 19176-81.
96. Sadri-Vakili, G., Bouzou, B., Benn, C. L., Kim, M. O., Chawla, P., Overland, R. P., Glajch, K. E., Xia, E., Qiu, Z., Hersch, S. M., Clark, T. W., Yohrling, G. J. & Cha, J. H. (2007) Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet*, 16(11), 1293-306.
97. Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. & Festenstein, R. (2003) DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature*, 422(6934), 909-13.
98. Schalkwyk, L. C., Meaburn, E. L., Smith, R., Dempster, E. L., Jeffries, A. R., Davies, M. N., Plomin, R. & Mill, J. (2010) Allelic skewing of DNA methylation is widespread across the genome. *Am J Hum Genet*, 86(2), 196-212.
99. Schmidl, C., Klug, M., Boeld, T. J., Andreessen, R., Hoffmann, P., Edinger, M. & Rehli, M. (2009) Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res*, 19(7), 1165-74.
100. Schones, D. E. & Zhao, K. (2008) Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet*, 9(3), 179-91.
101. Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T. & Minarik, G. (2013) Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*, 15(1), 5.
102. Semaka, A., Creighton, S., Warby, S. & Hayden, M. R. (2006) Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles. *Clin Genet*, 70(4), 283-94.
103. Semaka, A., Kay, C., Doty, C., Collins, J. A., Bijlsma, E. K., Richards, F., Goldberg, Y. P. & Hayden, M. R. (2013) CAG size-specific risk estimates for intermediate allele repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet*, 50(10), 696-703.

104. Seong, I. S., Woda, J. M., Song, J. J., Lloret, A., Abeyrathne, P. D., Woo, C. J., Gregory, G., Lee, J. M., Wheeler, V. C., Walz, T., Kingston, R. E., Gusella, J. F., Conlon, R. A. & MacDonald, M. E. (2010) Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum Mol Genet*, 19(4), 573-83.
105. Serre, D., Gurd, S., Ge, B., Sladek, R., Sinnett, D., Harmsen, E., Bibikova, M., Chudin, E., Barker, D. L., Dickinson, T., Fan, J. B. & Hudson, T. J. (2008) Differential allelic expression in the human genome: a robust approach to identify genetic and epigenetic cis-acting mechanisms regulating gene expression. *PLoS Genet*, 4(2), e1000006.
106. Shen, L. & Waterland, R. A. (2007) Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(5), 576-81.
107. Shoulson, I. & Young, A. B. (2011) Milestones in huntington disease. *Mov Disord*, 26(6), 1127-33.
108. Siedlecki, J. A. (2011) Choroby nowotworowe, w: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej* (Red. J. Bal). Wyd. PWN. Warszawa, 226-257.
109. Sitek, E. J., Sołtan, W., Wieczorek, D., Schinwelski, M., Robowski, P., Reilmann, R., Guzińska, K., Harciarek, M., Krysa, W. & Sławek, J. (2011) Self-awareness of motor dysfunction in patients with Huntington's disease in comparison to Parkinson's disease and cervical dystonia. *J Int Neuropsychol Soc*, 17(5), 788-95.
110. Sławek, J., Sołtan, W. & Sitek, E. J. (2013) Choroba Huntingtona : w 20. rocznicę odkrycia genu *IT15*; patogeneza, diagnostyka i leczenie. *Pol Przegl Neurol*, 9(3), 85-95.
111. Smith, R., Bacos, K., Fedele, V., Soulet, D., Walz, H. A., Obermüller, S., Lindqvist, A., Björkqvist, M., Klein, P., Onnerfjord, P., Brundin, P., Mulder, H. & Li, J. Y. (2009) Mutant huntingtin interacts with {beta}-tubulin and disrupts vesicular transport and insulin secretion. *Hum Mol Genet*, 18(20), 3942-54.
112. Snell, R. G., MacMillan, J. C., Cheadle, J. P., Fenton, I., Lazarou, L. P., Davies, P., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Harper, P. S. & Shaw, D. J. (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*, 4(4), 393-7.
113. Soragni, E., Herman, D., Dent, S. Y., Gottesfeld, J. M., Wells, R. D. & Napierala, M. (2008) Long intronic GAA*TTC repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, 36(19), 6056-65.

114. Stack, E. C., Del Signore, S. J., Luthi-Carter, R., Soh, B. Y., Goldstein, D. R., Matson, S., Goodrich, S., Markey, A. L., Cormier, K., Hagerty, S. W., Smith, K., Ryu, H. & Ferrante, R. J. (2007) Modulation of nucleosome dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 16(10), 1164-75.
115. Stine, O. C., Pleasant, N., Franz, M. L., Abbott, M. H., Folstein, S. E. & Ross, C. A. (1993) Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet*, 2(10), 1547-9.
116. Stout, J. C., Paulsen, J. S., Queller, S., Solomon, A. C., Whitlock, K. B., Campbell, J. C., Carlozzi, N., Duff, K., Beglinger, L. J., Langbehn, D. R., Johnson, S. A., Biglan, K. M. & Aylward, E. H. (2011) Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology*, 25(1), 1-14.
117. Suzuki, M. M. & Bird, A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9(6), 465-76.
118. Swami, M., Hendricks, A. E., Gillis, T., Massood, T., Mysore, J., Myers, R. H. & Wheeler, V. C. (2009) Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Hum Mol Genet*, 18(16), 3039-47.
119. Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Krzyzosiak, W. J., Figlerowicz, M. & Figiel, M. (2015) Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Dis Model Mech*, 8(9), 1047-57.
120. Tabrizi, S. J., Langbehn, D. R., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S. L., Fox, N. C., Scahill, R. I., Borowsky, B., Tobin, A. J., Rosas, H. D., Johnson, H., Reilmann, R., Landwehrmeyer, B., Stout, J. C. & TRACK-HD investigators (2009) Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol*, 8(9), 791-801.
121. Tassone, F., Hagerman, R. J., Loesch, D. Z., Lachiewicz, A., Taylor, A. K. & Hagerman, P. J. (2000) Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet*, 94(3), 232-6.
122. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971-83.

123. Tost, J. & Gut, I. G. (2007) Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. *Methods Mol Biol*, 373, 89-102.
124. Trottier, Y., Biancalana, V. & Mandel, J. L. (1994) Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet*, 31(5), 377-82.
125. Urdinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V. & Esteller, M. (2009) Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*, 8(11), 1056-72.
126. van der Burg, J. M., Björkqvist, M. & Brundin, P. (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol*, 8(8), 765-74.
127. Villar-Menéndez, I., Blanch, M., Tyebji, S., Pereira-Veiga, T., Albasanz, J. L., Martín, M., Ferrer, I., Pérez-Navarro, E. & Barrachina, M. (2013) Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular Med*, 15(2), 295-309.
128. Wang, C., Peng, H., Li, J., Ding, D., Chen, Z., Long, Z., Peng, Y., Zhou, X., Ye, W., Li, K., Xu, Q., Ai, S., Song, C., Weng, L., Qiu, R., Xia, K., Tang, B. & Jiang, H. (2017) Alteration of methylation status in the ATXN3 gene promoter region is linked to the SCA3/MJD. *Neurobiol Aging*, 53, 192.e5-192.e10.
129. Wang, F., Yang, Y., Lin, X., Wang, J. Q., Wu, Y. S., Xie, W., Wang, D., Zhu, S., Liao, Y. Q., Sun, Q., Yang, Y. G., Luo, H. R., Guo, C., Han, C. & Tang, T. S. (2013) Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 22(18), 3641-53.
130. Warby, S. C., Visscher, H., Collins, J. A., Doty, C. N., Carter, C., Butland, S. L., Hayden, A. R., Kanazawa, I., Ross, C. J. & Hayden, M. R. (2011) HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet*, 19(5), 561-6.
131. Watson, C. T., Roussos, P., Garg, P., Ho, D. J., Azam, N., Katsel, P. L., Haroutunian, V. & Sharp, A. J. (2016) Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer's disease. *Genome Med*, 8(1), 5.
132. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M. & Schübeler, D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, 39(4), 457-66.

133. Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayán, J., Brocklebank, D., Cherny, S. S., Cardon, L. R., Gray, J., Dlouhy, S. R., Wiktorski, S., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Penney, J. B., Gusella, J., Cha, J. H., Irizarry, M., Rosas, D., Hersch, S., Hollingsworth, Z., MacDonald, M., Young, A. B., Andresen, J. M., Housman, D. E., De Young, M. M., Bonilla, E., Stillings, T., Negrette, A., Snodgrass, S. R., Martinez-Jaurrieta, M. D., Ramos-Arroyo, M. A., Bickham, J., Ramos, J. S., Marshall, F., Shoulson, I., Rey, G. J., Feigin, A., Arnheim, N., Acevedo-Cruz, A., Acosta, L., Alvir, J., Fischbeck, K., Thompson, L. M., Young, A., Dure, L., O'Brien, C. J., Paulsen, J., Brickman, A., Krch, D., Peery, S., Hogarth, P., Higgins, D. S., Landwehrmeyer, B. & U.S.-Venezuela Collaborative Research Project (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(10), 3498-503.
134. Xu, J., Pope, S. D., Jazirehi, A. R., Attema, J. L., Papathanasiou, P., Watts, J. A., Zaret, K. S., Weissman, I. L. & Smale, S. T. (2007) Pioneer factor interactions and unmethylated CpG dinucleotides mark silent tissue-specific enhancers in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(30), 12377-82.
135. Yan, H., Dobbie, Z., Gruber, S. B., Markowitz, S., Romans, K., Giardiello, F. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2002) Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet*, 30(1), 25-6.
136. Yong, W. S., Hsu, F. M. & Chen, P. Y. (2016) Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin*, 9, 26.
137. Zajac, M. S., Pang, T. Y., Wong, N., Weinrich, B., Leang, L. S., Craig, J. M., Safery, R. & Hannan, A. J. (2010) Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus*, 20(5), 621-36.
138. Zielonka, D., Klimberg, A. & Marcinkowski, J., T. (2014) Recruitment rate for studies on Huntington's disease in Poland. 8th EHDN Plenary Meeting. Barcelona, Spain, 19-21 September 2014 : programme and abstracts.
139. Zilberman, D. & Henikoff, S. (2007) Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*, 134(22), 3959-65.

10. ZAŁĄCZNIK

Tab. 23. Sekwencje starterów użytych do analizy MSRE-qPCR dla genów: *HTT*, *MGMT*, *RASSF1A* i *CCND2*. F- starter (ang.) *forward*, R- starter (ang.) *revers*

Nazwa genu	Startery	Sekwencja (5'-3')
<i>HTT</i> (region 1)*	F	CTGGCTAAAGTAGGCTTTACTG
	R	GGAGTAAGGTTGGCCTCA
<i>HTT</i> (region 3)*	F	CGGGTGAGTATGGCTCT
	R	CATGCGGAAAGGATCCC
<i>MGMT</i>	F	CCTGACAGGGTCTCTGCTGGTCTG
	R	GTGCCCCGAGTGGTCCTGAAAGC
<i>RASSF1A</i>	F	GCCCAAAGCCAGCGAAGCAC
	R	CCAGATGAAGTCGCCACAGAGGT
<i>CCND2</i>	F	GAAACGCCACCAGATCGTATCTCC
	R	CGCAAACACCACCACCCTT

* numerację regionów genu *HTT* podano zgodnie z ryc. 9 na str. 57

Tab. 24. Analiza porównawcza wyników badania metylacji DNA, przeprowadzonego techniką MRSE-qPCR z zastosowaniem dwóch różnych matryc DNA referencyjnego: nietrawionej oraz trawionej enzymem *HpyF30I*

Nazwa genu	Próbka*	Stopień metylacji DNA		Stosunek wartości z kolumny 3 i 4	Wartość p dla różnic między uzyskanymi wynikami (test T-Studenta)**
		DNA referencyjny nietrawiony	DNA referencyjny trawiony <i>HpyF30I</i>		
<i>HTT</i> (region 1)	1	0,853	0,666	1,280	0,025
	2	0,866	0,628	1,379	< 0,01
	3	1,840	0,666	2,764	< 0,01
	4	0,905	0,598	1,514	0,062
<i>HTT</i> (region 3)	1	0,002	0,001	2,045	0,027
	2	0,006	0,003	2,296	0,084
	3	0,018	0,018	1,025	0,082
	4	0,013	0,004	3,350	0,051
<i>MGMT</i>	1	0,441	0,104	4,264	< 0,01
	2	0,359	0,075	4,765	0,018
	3	0,391	0,111	3,512	< 0,01
	4	0,372	0,124	3,005	< 0,01
<i>RASSF1A</i>	1	0,017	0,017	0,988	1,000
	2	0,035	0,030	1,167	0,420
	3	0,012	0,011	1,071	0,693
	4	0,026	0,024	1,062	0,644
<i>CCND2</i>	1	0,004	0,001	2,736	0,054
	2	0,005	0,002	2,970	0,112
	3	0,005	0,002	2,735	< 0,01
	4	0,004	0,001	2,984	0,038

* Numery 1, 2, 3, 4 zostały przypisane pacjentom o nr odpowiednio: 111, 118, 121 i 136;

** Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki istotne statystycznie na poziomie istotności $p=0,05$

Tab. 25. Wyniki stopnia metylacji DNA w regionach 1, 2 i 4 genu *HTT*, uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie pacjentów z HD (n=151). Podano wartości w %, uśrednione dla trzech oznaczeń. Min- wartość minimalna, Max- wartość maksymalna, SD - odchylenie standardowe

Nr	1	2	4	Nr	1	2	4	Nr	1	2	4	Nr	1	2	4
3	53,72	28,04	75,48	80	54,34	45,35	71,02	137	68,00	37,43	93,37	227	59,09	44,94	78,94
6	57,13	43,06	73,20	81	57,41	35,03	81,85	140	63,73	43,17	79,45	228	59,97	38,00	77,82
7	52,71	27,56	72,63	82	57,65	37,01	74,40	141	57,49	36,15	75,95	229	57,89	34,30	74,21
8	53,07	35,99	70,69	83	65,16	35,95	82,92	145	62,01	42,41	81,92	233	59,66	44,19	80,49
10	55,82	38,49	69,44	84	61,16	54,80	88,04	146	53,15	39,39	84,72	235	64,27	36,10	88,14
11	55,64	40,96	71,79	85	64,94	35,16	84,72	147	54,49	32,80	71,40	236	56,91	30,62	73,24
12	54,27	38,06	81,36	86	68,01	36,03	84,85	151	62,76	38,77	73,56	237	67,67	40,48	73,25
14	48,14	39,66	75,95	87	56,72	37,55	70,70	152	51,86	33,03	71,16	238	56,19	41,22	77,34
16	54,72	35,39	83,08	88	56,96	37,02	74,95	154	64,61	43,47	90,33	245	54,34	26,99	82,18
18	57,70	38,41	76,55	91	54,40	31,24	81,61	156	62,99	46,57	73,52	247	50,26	28,67	70,00
20	56,24	51,69	75,02	92	45,20	30,34	72,53	158	59,14	31,73	73,54	285	52,06	39,15	77,73
21	51,39	37,37	71,55	96	49,93	40,62	73,32	161	61,69	45,18	75,85	286	52,55	33,35	76,02
22	52,74	43,23	74,43	97	43,99	34,14	72,94	165	52,37	37,94	72,04	287	52,69	36,29	76,40
23	57,41	33,89	86,10	98	52,02	34,96	76,20	166	64,18	46,53	77,23	289	57,68	37,98	69,14
30	66,19	31,60	87,98	99	61,41	48,20	73,22	167	53,66	28,23	70,98	302	53,94	25,14	80,12
34	52,42	36,26	72,15	100	56,36	32,88	85,25	168	47,47	24,12	76,69	307	48,24	32,64	70,06
36	55,95	46,41	81,96	101	55,16	40,12	82,09	169	52,28	34,89	77,44	317	62,26	34,12	72,65
39	54,02	26,73	80,42	103	57,08	35,51	89,03	170	62,56	43,30	71,25	318	50,62	33,30	83,31
40	54,74	27,21	81,22	106	53,21	39,26	71,72	175	65,45	28,85	81,71	319	55,91	40,41	70,71
42	55,20	30,15	81,15	107	54,97	33,48	77,68	177	49,89	36,45	75,52	322	57,10	45,39	73,25
43	62,64	37,04	79,86	109	56,78	34,83	76,72	178	63,50	36,98	91,12	323	62,64	35,12	80,20
45	67,54	35,76	78,73	110	50,50	37,04	70,25	180	60,70	27,75	84,00	324	54,56	38,43	89,55
49	64,61	45,35	86,35	112	58,83	52,13	83,80	181	58,67	38,58	78,07	325	66,85	47,12	95,67
51	64,10	43,10	81,45	117	50,64	38,83	77,71	183	56,40	36,64	76,12	326	55,91	44,00	86,28
52	54,27	32,35	75,51	118	52,10	32,07	71,72	184	54,46	31,95	70,60	328	47,88	35,50	70,73
53	51,92	44,91	79,60	119	59,23	52,27	79,62	185	58,98	40,10	77,56	329	53,37	43,59	80,10
57	59,87	37,77	92,29	120	57,01	37,38	76,62	186	67,88	45,72	87,14	330	68,06	48,46	78,46
59	55,29	45,71	82,72	121	53,18	41,66	84,74	208	48,61	26,19	74,46	331	50,98	31,39	76,30
64	52,77	43,20	83,58	122	53,33	37,65	76,64	209	57,66	42,45	78,20	332	59,03	41,57	69,16
65	51,06	27,93	87,27	124	46,24	29,72	77,08	211	51,38	42,85	75,50	335	55,08	35,07	71,40
66	54,47	41,43	79,23	125	53,12	34,98	79,16	212	59,07	42,72	79,30	337	53,61	38,20	74,35
67	53,26	43,45	71,89	127	52,86	37,39	72,55	218	60,25	37,76	70,81	366	62,79	44,11	91,95
71	66,68	54,08	82,97	129	57,68	35,87	78,47	219	54,57	33,82	76,67	370	53,60	31,77	76,72
73	60,61	47,75	80,05	131	68,21	50,50	79,10	220	42,74	33,19	81,05	377	57,86	36,89	73,26
75	62,79	38,47	75,34	132	57,17	36,89	77,36	221	58,44	33,61	77,87	379	52,46	36,64	77,02
77	51,70	34,06	78,35	134	61,64	38,51	85,13	222	63,82	51,94	85,28	380	49,33	27,24	76,25
78	64,68	22,02	85,14	135	57,13	34,03	81,51	224	60,96	42,94	87,60	381	64,99	48,74	78,21
79	57,12	45,73	76,44	136	59,77	29,81	87,71	226	60,74	31,61	76,30				

Region 1: średnia 56,91, min. 42,74, max. 68,21, SD 5,45; Region 2: średnia 37,82, min. 22,02, max. 54,80, SD 6,48; Region 4: średnia 78,34 min. 69,14, max. 95,67, SD 5,78

Tab. 26. Wyniki poziomu metylacji DNA w regionach 1, 2 i 4 genu *HTT* (PM1, PM2, PM4), uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie kontrolnej (n=117). Podano wartości w %, uśrednione dla trzech oznaczeń. Min- wartość minimalna, Max- wartość maksymalna, SD - odchylenie standardowe

Nr	PM1	PM2	PM4	Nr	PM1	PM2	PM4	Nr	PM1	PM2	PM4	Nr	PM1	PM2	PM4
1	49,57	34,23	79,00	200	56,38	41,18	74,82	269	48,65	38,10	78,80	340	59,47	27,11	80,38
5	51,67	23,91	85,29	201	52,87	38,20	75,77	270	59,52	34,12	85,63	343	61,94	48,00	80,39
17	57,04	44,56	73,95	202	53,36	35,22	78,76	271	54,12	37,60	68,12	344	54,32	37,23	74,73
24	50,86	33,82	73,14	203	53,15	40,83	83,66	272	59,52	29,79	67,60	345	55,34	42,30	81,83
26	57,55	40,53	69,91	204	59,71	36,57	87,18	273	55,73	25,50	81,65	347	52,76	33,23	76,59
28	50,76	34,10	74,07	207	58,71	40,47	87,34	274	61,49	46,56	75,56	348	66,33	37,02	80,92
31	53,54	34,49	80,52	210	58,37	45,66	76,58	275	59,55	31,37	74,62	349	55,32	41,45	73,50
38	65,00	42,58	92,24	213	65,91	41,60	79,11	276	46,29	26,59	76,31	351	58,65	47,22	87,16
54	56,16	37,39	71,96	214	57,06	47,91	85,02	277	60,62	33,63	84,57	353	59,17	37,23	79,12
55	56,16	42,18	67,60	215	52,14	32,33	75,29	278	66,98	44,92	76,07	355	54,47	18,99	77,71
58	67,06	39,12	80,77	216	56,73	37,78	78,04	279	55,29	49,70	77,56	360	61,69	33,23	78,35
72	60,89	46,24	83,22	230	58,29	41,17	79,18	280	59,93	32,18	77,62	374	52,37	24,61	78,23
90	55,21	42,06	81,16	239	53,89	39,00	71,72	281	51,33	34,77	81,46				
93	48,64	44,58	82,47	240	52,53	32,96	73,44	282	59,95	38,94	71,05				
115	53,48	36,30	70,76	241	68,52	32,97	75,54	283	64,24	50,74	82,94				
123	53,98	43,07	81,52	242	52,35	37,70	82,46	284	54,58	40,66	77,56				
130	51,31	29,85	73,62	243	65,00	38,47	72,03	290	61,81	47,07	88,80				
142	54,78	38,59	78,21	248	53,43	47,09	81,67	291	60,43	40,23	78,38				
143	52,69	36,26	68,22	249	62,47	39,63	74,73	292	58,92	45,41	76,07				
148	54,81	31,11	86,44	250	67,41	35,03	81,30	293	47,12	31,06	83,05				
149	56,68	37,47	72,90	251	47,04	36,57	68,34	294	65,53	45,73	82,26				
150	53,38	32,67	87,59	252	54,55	34,09	76,96	295	53,31	30,32	76,80				
162	62,28	31,78	82,69	255	53,76	33,26	83,04	296	64,47	46,85	79,03				
172	55,46	44,50	74,55	256	56,11	28,73	87,91	297	61,18	43,51	77,85				
176	58,57	38,42	75,92	257	51,51	31,73	75,33	299	48,16	38,23	84,24				
188	63,32	46,22	84,95	259	59,78	41,60	78,02	300	55,40	33,22	82,74				
189	54,20	48,07	76,67	260	53,85	47,57	79,60	301	63,13	46,53	90,14				
190	63,13	47,76	84,80	261	50,06	33,46	78,54	306	58,97	43,56	69,92				
191	61,16	35,21	71,27	262	60,48	34,96	85,49	308	56,66	38,83	76,57				
193	58,98	44,78	78,11	263	48,95	41,93	80,68	309	59,77	46,08	77,32				
194	64,70	45,24	72,69	264	51,81	34,53	81,93	310	59,02	31,30	83,56				
196	68,06	43,30	88,73	265	57,31	42,90	92,81	311	57,72	39,77	80,66				
197	53,39	39,47	78,72	266	55,91	35,41	76,12	312	56,61	40,25	84,71				
198	55,77	41,80	62,65	267	66,13	43,27	83,77	313	58,81	26,71	80,82				
199	63,78	47,83	81,10	268	57,75	44,20	82,60	314	64,06	32,77	73,67				

Region 1: średnia 57,25, min. 46,29, max. 68,52, SD 5,09; Region 2: średnia 38,42, min. 18,98, max. 50,74, SD 6,35; Region 4: średnia 78,84 min. 62,65, max. 92,80, SD 5,58

Tab. 27. Wyniki poziomu metylacji DNA w regionie 3 genu *HTT* (PM3), uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie pacjentów z HD (n=60) i w grupie kontrolnej (n=50). Podano wartości w %, uśrednione dla trzech oznaczeń. Min- wartość minimalna, Max- wartość maksymalna, SD - odchylenie standardowe

Grupa badana (n=60)				Grupa kontrolna (n=50)			
Nr próbki	PM3	Nr próbki	PM3	Nr próbki	PM3	Nr próbki	PM3
8	0,07	112	0,37	5	0,23	272	0,35
14	0,06	117	0,08	90	0,03	273	0,05
16	0,11	118	0,17	93	0,07	275	0,08
20	0,09	119	0,11	130	0,07	276	0,08
21	0,27	121	0,81	148	0,17	279	0,09
34	0,19	122	0,13	191	0,22	280	1,20
36	0,13	124	0,11	193	0,21	295	0,19
40	0,14	125	0,17	194	0,00	296	0,10
49	0,15	129	0,08	197	0,00	297	0,06
51	0,06	136	0,30	198	0,13	300	0,06
52	0,41	137	0,13	201	0,26	306	0,16
53	0,10	140	0,27	202	0,13	308	0,20
57	0,17	141	0,05	203	0,12	310	0,28
59	0,10	154	0,15	214	0,19	311	0,08
64	0,04	156	0,48	240	0,20	313	0,17
66	0,11	161	0,14	241	0,17	340	0,00
67	0,08	168	0,83	243	0,00	344	0,10
71	0,07	169	0,10	248	0,16	345	0,19
73	0,12	170	0,19	252	0,28	347	0,23
77	0,06	180	0,46	255	0,37	348	0,08
78	0,47	183	0,15	256	2,32		
79	0,03	186	0,07	257	0,22		
81	0,02	221	0,11	259	0,11		
82	0,38	222	1,62	260	0,00		
85	0,04	224	0,12	261	0,10		
86	0,14	229	0,27	262	0,34		
91	0,04	235	0,30	263	0,17		
107	0,09	324	0,20	268	0,27		
109	0,05	326	0,06	269	0,18		
110	0,09	330	0,07	271	0,06		

Grupa badana: średnia 0,19, min. 0,02, max. 1,61, SD 0,25;

Grupa kontrolna: średnia 0,20, min. 0,00, max. 2,32, SD 0,32

Tab. 28. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i płci chorego rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=318	b	SE	t	p
W. wolny	15,3395	0,6162	24,8942	< 0,01
$\text{Ln}(\text{CAG})_n$	-3,0869	0,1634	-18,8926	< 0,01
Płeć rodzica z HD	0,0115	0,0209	0,5473	0,5845
Dopasowanie modelu				
R²	0,531		F	178,62
R²_{adj}	0,528		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t; **p** – poziom istotności; **R²** – współczynnik determinacji; **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

Tab. 29. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i występowania choroby u rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie.

N=368	b	SE	t	p
W. wolny	15,1909	0,5623	27,0144	< 0,01
$\text{Ln}(\text{CAG})_n$	-3,0202	0,1503	-20,0951	< 0,01
Rodzic z HD	-0,0968	0,0281	-3,4502	< 0,01
Dopasowanie modelu				
R²	0,554		F	226,83
R²_{adj}	0,554		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t; **p** – poziom istotności; **R²** – współczynnik determinacji; **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

Tab. 30. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i wieku zachorowania rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$. Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

N=280	b	SE	t	p
W. wolny	10,6327	0,8935	11,9002	< 0,01
$\text{Ln}(\text{CAG})_n$	-2,2157	0,2021	-10,9631	< 0,01
$\text{Ln}(\text{AOO}$ rodzica)	0,3751	0,0506	7,4080	< 0,01
Dopasowanie modelu				
R²	0,6152		F	221,44
R²_{adj}	0,612		p	< 0,01

N – liczebność grupy badanej; **b** – niestandardyzowany współczynnik regresji; **SE** – błąd standardowy współczynnika regresji; **t** – wartość statystyki t; **p** – poziom istotności; **R²** – współczynnik determinacji; **R²_{adj}** – skorygowany współczynnik determinacji; **F** – wartość statystyki F

Tab. 31. Podsumowanie dopasowania modeli regresyjnych, oszacowanych w grupie pacjentów, u których określono stopień metylacji genu *HTT* metodą MSRE-qPCR (n=151)

Zależność	R ²	R ² _{adj}	F	p
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomów metylacji w regionach 1,2 i 4 <i>HTT</i>	0,724	0,716	95,638	< 0,01
Liczby pkt. w skali TMS od wieku, Ln((CAG) _n) oraz stopnia metylacji DNA w regionie 4 <i>HTT</i>	0,180	0,164	10,780	< 0,01
Liczby pkt. w skali TFC od wieku i Ln((CAG) _n)	0,199	0,189	18,428	< 0,01
Liczby pkt. w Skali Funkcjonowania (SF) od wieku, płci i Ln((CAG) _n)	0,241	0,225	15,530	< 0,01

R² – współczynnik determinacji; R²_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; F – wartość statystyki F; p – poziom istotności

Tab. 32. Oszacowania i istotność parametrów dla wybranych zależności, określonych w grupie pacjentów, u których określono stopień metylacji genu *HTT* metodą MSRE-qPCR (n=151). Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

Zależność	Zmienna	b	SE	t	p
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomów metylacji w regionach 1,2 i 4 <i>HTT</i> (PM1, 2 i 4)	W. wolny	13,9065	0,5354	25,9759	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-2,7337	0,1431	-19,0997	< 0,01
	PM1	0,0012	0,0032	0,3912	0,6962
	PM2	0,0008	0,0024	0,3421	0,7327
	PM4	0,0001	0,0027	0,0513	0,9592
Liczby pkt. w skali TMS od wieku, Ln((CAG) _n) i poziomu metylacji w regionie 4 <i>HTT</i> (PM4)	W. wolny	-499,803	112,9947	-4,4232	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	141,876	27,5263	5,1542	< 0,01
	Wiek	1,162	0,2253	5,1564	< 0,01
	PM4	-0,587	0,3022	-1,9416	0,0541
Liczby pkt. w skali TFC od wieku i Ln((CAG) _n)	W. wolny	106,0228	16,6286	6,3759	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-23,4915	4,0422	-5,8116	< 0,01
	Wiek	-0,1889	0,0333	-5,6681	< 0,01
Liczby pkt. w skali TFC od wieku, płci i Ln((CAG) _n)	W. wolny	208,5107	29,1923	7,1427	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-45,9524	7,0971	-6,4748	< 0,01
	Płeć	1,4665	0,9246	1,5861	0,1149
	Wiek	-0,3654	0,0588	-6,2177	< 0,01

b – niestandardyzowany współczynnik regresji; SE – błąd standardowy współczynnika regresji; t – wartość statystyki t; p – poziom istotności

Tab. 33. Podsumowanie dopasowania modeli regresyjnych, oszacowanych w grupie pacjentów z (CAG)_n ≤ 50, u których określono stopień metylacji genu *HTT* metodą MSRE-qPCR (n=137)

Zależność	R ²	R ² _{adj}	F	p
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomów metylacji w regionach 1,2 i 4 <i>HTT</i>	0,573	0,560	44,29	< 0,01
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomu metylacji w regionie 1 <i>HTT</i>	0,572	0,566	89,65	< 0,01
Liczby pkt. w skali TMS od wieku, Ln((CAG) _n) oraz stopnia metylacji DNA w regionie 4 <i>HTT</i>	0,198	0,180	10,97	< 0,01
Liczby pkt. w skali TFC od wieku i Ln((CAG) _n)	0,176	0,164	14,32	< 0,01
Liczby pkt. w Skali Funkcjonowania (SF) od wieku, płci i Ln((CAG) _n)	0,210	0,192	11,76	< 0,01

R² – współczynnik determinacji; R²_{adj} – skorygowany współczynnik determinacji; F – wartość statystyki F; p – poziom istotności

Tab. 34. Oszacowania i istotność parametrów dla wybranych zależności, określonych w grupie pacjentów z (CAG)_n ≤ 50, u których określono stopień metylacji genu *HTT* metodą MSRE-qPCR (n=137). Kolorem czerwonym zaznaczono zmienne istotne statystycznie

Zależność	Zmienna	b	SE	t	p
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomów metylacji w regionach 1,2 i 4 <i>HTT</i> (PM1, 2 i 4)	W. wolny	15,2278	0,9031	16,8609	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-3,1040	0,2404	-12,9109	< 0,01
	PM1	0,0031	0,0032	0,9535	0,3421
	PM2	0,0011	0,0024	0,4601	0,6462
	PM4	-0,0003	0,0028	-0,1216	0,9034
Ln(AOO) od Ln((CAG) _n) i poziomu metylacji w regionie 1 <i>HTT</i> (PM1)	W. wolny	15,2527	0,8588	17,7615	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-3,1123	0,2366	-13,1535	< 0,01
	PM1	0,0034	0,0027	1,2847	0,2011
Liczby pkt. w skali TMS od wieku, Ln((CAG) _n) i poziomu metylacji w regionie 4 <i>HTT</i> (PM4)	W. wolny	-859,900	182,5245	-4,7112	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	232,727	45,4541	5,1201	< 0,01
	Wiek	1,381	0,2593	5,3276	< 0,01
	PM4	-0,485	0,3156	-1,5379	0,1265
Liczby pkt. w skali TFC od wieku i Ln((CAG) _n)	W. wolny	127,6575	27,3116	4,6741	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-28,9745	6,8379	-4,2373	< 0,01
	Wiek	-0,2087	0,0390	-5,3491	< 0,01
Liczby pkt. w skali TFC od wieku, płci i Ln((CAG) _n)	W. wolny	245,9717	47,8405	5,1415	< 0,01
	Ln((CAG) _n)	-55,4229	11,9794	-4,6265	< 0,01
	Płeć	1,5796	0,9611	1,6435	0,1026
	Wiek	-0,4022	0,0687	-5,8548	< 0,01

b – niestandardyzowany współczynnik regresji; SE – błąd standardowy współczynnika regresji; t – wartość statystyki t; p – poziom istotności

11. SPIS TABEL

Tab. 1. Parametry kliniczne oceniane w skali UHDRS (ang. <i>The Unified Huntington's Disease Rating Scale</i>)	25
Tab. 2. Modyfikacje potranslacyjne histonów	32
Tab. 3. Charakterystyka grupy 452 pacjentów z HD pod względem wywiadu rodzinnego	49
Tab. 4. Charakterystyka grupy 452 pacjentów z HD pod względem wybranych parametrów	49
Tab. 5. Wywiad rodzinny w kierunku HD w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$	50
Tab. 6. Charakterystyka pacjentów, u których przeprowadzono badanie metodą MSRE-qPCR, pod względem analizowanych zmiennych	54
Tab. 7. Charakterystyka grupy kontrolnej	55
Tab. 8. Składy mieszanin reakcyjnych w reakcjach trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi	56
Tab. 9. Sekwencje starterów użytych do analizy MSRE-qPCR dla poszczególnych fragmentów genu <i>HTT</i>	57
Tab. 10. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji qPCR	59
Tab. 11. Profil termiczny reakcji qPCR	59
Tab. 12. Charakterystyka osób, u których oznaczono profil metylacji genu <i>HTT</i> metodą mikromacierzy metylacyjnych	64
Tab. 13. Oczekiwany wiek zachorowania (AOO) wśród nosicieli wybranych alleli w genie <i>HTT</i> oraz zmiany w AOO, wywołane zwiększeniem liczby powtórzeń CAG ($(CAG)_n$)	69
Tab. 14. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ i płci chorego rodzica	70
Tab. 15. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ i występowania choroby u rodzica	72
Tab. 16. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ i wieku zachorowania rodzica	73
Tab. 17. Modelowanie zmiennej zależnej AOO w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona	73
Tab. 18. Modelowanie zmiennej zależnej AOO w grupie pacjentów z $(CAG)_n \leq 50$	74
Tab. 19. Podsumowanie wyników metylacji wybranych CgG w grupie pacjentów z HD	87
Tab. 20. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\ln(AOO)$ od $\ln(CAG)_n$ i poziomu metylacji DNA w dinukleotydzie CpG nr 1 (SM1)	89

Tab. 21. Podsumowanie analizy profili metylacji DNA w regionie promotorowym i w pierwszym eksonie genu <i>HTT</i> , pochodzących od 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 16 zdrowych ochotników	90
Tab. 22. Podsumowanie analizy profili metylacji DNA w regionie <i>gene body</i> i 3'UTR genu <i>HTT</i> , pochodzących od 32 pacjentów z chorobą Huntingtona oraz 16 zdrowych ochotników	91
Tab. 23. Sekwencje starterów użytych do analizy MSRE-qPCR dla genów: <i>HTT</i> , <i>MGMT</i> , <i>RASSF1A</i> i <i>CCND2</i>	125
Tab. 24. Analiza porównawcza wyników badania metylacji DNA, przeprowadzonego techniką MRSE-qPCR z zastosowaniem dwóch różnych matryc DNA referencyjnego: nietrawionej oraz trawionej enzymem <i>HpyF30I</i>	126
Tab. 25. Wyniki stopnia metylacji DNA w regionach 1, 2 i 4 genu <i>HTT</i> , uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie badanej (n=151)	127
Tab. 26. Wyniki poziomu metylacji DNA w regionach 1, 2 i 4 genu <i>HTT</i> (PM1, PM2, PM4), uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie kontrolnej (n=117)	128
Tab. 27. Wyniki poziomu metylacji DNA w regionie 3 genu <i>HTT</i> (PM3), uzyskane techniką MSRE-qPCR w grupie badanej (n=60) i w grupie kontrolnej (n=50)	129
Tab. 28. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i płci chorego rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$	130
Tab. 29. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i występowania choroby u rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$	130
Tab. 30. Podsumowanie wyników regresji dla zależności $\text{Ln}(\text{AOO})$ od $\text{Ln}(\text{CAG})_n$ i wieku zachorowania rodzica w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$	130
Tab. 31. Podsumowanie dopasowania modeli regresyjnych, oszacowanych w grupie pacjentów, u których określono stopień metylacji genu <i>HTT</i> metodą MSRE-qPCR	131
Tab. 32. Oszacowania i istotność parametrów dla wybranych zależności, określonych w grupie pacjentów, u których określono stopień metylacji genu <i>HTT</i> metodą MSRE-qPCR (n=151)	131
Tab. 33. Podsumowanie dopasowania modeli regresyjnych, oszacowanych w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$, u których określono stopień metylacji genu <i>HTT</i> metodą MSRE-qPCR (n=137)	132
Tab. 34. Oszacowania i istotność parametrów dla wybranych zależności, określonych w grupie pacjentów z $(\text{CAG})_n \leq 50$, u których określono stopień metylacji genu <i>HTT</i> metodą MSRE-qPCR (n=137)	132

12. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Schemat budowy genu <i>HTT</i> z uwzględnieniem zakresów liczby powtórzeń trójnukleotydowych CAG ((CAG) _n), zlokalizowanych w pierwszym eksonie genu	16
Ryc. 2. Naturalny przebieg choroby Huntingtona	20
Ryc. 3. Wybrane zmiany w obrazie klinicznym i neuropatologicznym przedobjawowej oraz wczesnej fazy choroby Huntingtona, stwierdzone w prospektywnym badaniu TRACK-HD	23
Ryc. 4. Zależność pomiędzy liczbą powtórzeń CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i> a wiekiem pojawienia się objawów ruchowych HD (AOMO, ang. <i>age of motor onset</i>)	27
Ryc. 5. Wpływ metylacji DNA na aktywność transkrypcyjną genu	31
Ryc. 6. Metody oceny metylacji DNA	41
Ryc. 7. Metody oceny metylacji dinukleotydów CpG pojedynczego genu	45
Ryc. 8. Liczebność grupy badanej w zależności od liczby powtórzeń CAG w genie <i>HTT</i>	54
Ryc. 9. Lokalizacja starterów w obrębie genu <i>HTT</i>	57
Ryc. 10. Krzywa standardowa dla reakcji amplifikacji regionu 4 genu <i>HTT</i> , wyznaczona na podstawie serii rozcieńczeń matrycy	58
Ryc. 11. Schemat badania poziomu metylacji DNA za pomocą metody MSRE-qPCR	60
Ryc. 12. Interpretacja wyników ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy	61
Ryc. 13. Procedura badania metylacji DNA The Infinium Methylation Assay (Illumina)	65
Ryc. 14. Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i> ((CAG) _n) w grupie pacjentów z chorobą Huntingtona (n=452)	69
Ryc. 15. Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu <i>HTT</i> ((CAG) _n) w grupie chorych z (CAG) _n ≤ 50 (n=389)	75
Ryc. 16. Wyniki analizy metylacji DNA, przeprowadzonej z zastosowaniem dwóch różnych próbek DNA referencyjnego, na genomowym DNA pochodzącym od czterech pacjentów (1, 2, 3, 4)	79
Ryc. 17. Krzywe amplifikacji produktów reakcji qPCR dla: A) genu <i>CCND2</i> , B) genu <i>MGMT</i> , C) genu <i>HTT</i> (region 1), przeprowadzonych na genomowym DNA pochodzącym od pacjenta nr 3	80

- Ryc. 18.** Podsumowanie wyników badania metylacji DNA, przeprowadzonego techniką MSRE-qPCR 81
- Ryc. 19.** Przykładowe krzywe amplifikacji produktów reakcji qPCR dla czterech badanych dinukleotydów CpG w genie *HTT* 82
- Ryc. 20.** Zależność wieku zachorowania (AOO) od liczby powtórzeń CAG w zmutowanym allelu *HTT* ((CAG)_n) wśród pacjentów, u których oznaczono stopień metylacji wybranych CpG metodą MSRE-qPCR 84