

UNIVERZA V LJUBLJANI  
SKUPNI INTERDISCIPLINARNI PROGRAM DRUGE STOPNJE KOGNITIVNA ZNANOST  
V SODELOVANJU Z UNIVERSITÄT WIEN,  
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE  
IN EÖTVÖS LORAND TUDOMÁNYEGYETEM

Jure Fabjan

**Biološki označevalci verjetne Alzheimerjeve bolezni**

Magistrsko delo

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
SKUPNI INTERDISCIPLINARNI PROGRAM DRUGE STOPNJE KOGNITIVNA ZNANOST  
V SODELOVANJU Z UNIVERSITÄT WIEN,  
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE  
IN EÖTVÖS LORAND TUDOMÁNYEGYETEM

Jure Fabjan

**Biološki označevalci verjetne Alzheimerjeve bolezni**

Magistrsko delo

**mentor:** Prof. dr. Damjana Rozman  
**somentor:** Prof. dr. Zvezdan Pirtošek, dr. med.

Ljubljana, 2018

## Povzetek

S staranjem prebivalstva postaja demenca vedno večji problem. Kar 70 %, od več kot 47 milijonov, primerov demence spada pod diagnozo Alzheimerjeve bolezni. Pod zgodnjo obliko Alzheimerjeve bolezni spada le od 1 % do 5 % vseh primerov. Za to obliko bolezni je značilna mendelska oblika dedovanja. Pri pozni obliki Alzheimerjeve bolezni je genetska komponenta šibkejša. Blaga kognitivna motnja je diagnoza, postavljena ljudem, ki imajo težave s kognicijo, vendar le-ti ne vplivajo na njihovo vsakdanje življenje. Ti ljudje imajo povišano tveganje za razvoj Alzheimerjeve bolezni. Če oseba opaža zmanjšanje kognitivne zmogljivosti, vendar klinični testi ne kažejo upada, se osebo uvrsti pod diagnozo subjektivne kognitivne pritožbe. Tveganje, ki ga ta skupina ljudi nosi za razvoj demence, še vedno ni znano. Najdenih je bilo že več kot dvajset genov, ki verjetno vplivajo na tveganje za pojav pozne oblike Alzheimerjeve bolezni, od katerih je najmočnejšo povezavo imel gen z zapisom za apolipoprotein E (ApoE). Od treh alelov je alel ApoE E4 povezan s povečanjem tveganja za razvoj bolezni, pri čemer je tveganje pri heterozigotih ApoE E4/- kar 3-krat višje kot pri homozigotih ApoE E3/E3, pri homozigotih ApoE E4/E4 pa kar od 8 do 12-krat. V naši raziskavi smo si zadali dva cilja: I) določiti frekvence alelov ApoE pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo v Sloveniji in II) najti nove potencialne biološke označevalce v že obstoječih podatkovnih zbirkah, ki bi jih bilo možno uporabiti pri diagnosticiranju verjetne Alzheimerjeve bolezni.

V raziskavi je sodelovalo 113 bolnikov, obravnavanih v ambulantah Centra za kognitivne motnje na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, Nevrološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Preiskovancem smo odvzeli kri, iz katere je bila izolirana DNA. Obenem smo zbrali tudi njihove klinične podatke. Zaradi prenizkega števila udeležencev s postavljeno diagnozo Alzheimerjeve bolezni, smo analizo opravili na bolnikih z diagnozami subjektivne kognitivne pritožbe, blage kognitivne motnje in kognitivnega upada. Tri skupine so se med seboj razlikovale v starosti in rezultatih testov kognicije, vendar ne v frekvencah genotipov in alelov ApoE. Genotipizirana populacija se po frekvencah genotipov ApoE statistično pomembno razlikuje od splošne evropske populacije

Da bi našli nove potencialne biološke označevalce, smo zbrali že obstoječe asociacijske študije celotnega genoma, opravljene na populacijah bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo. Rezultate teh študij smo analizirali s pomočjo spletnega orodja Integratomics (<http://genepark.mf.uni-lj.si/integratomics/home>). Najvišji rezultat si je delilo trinajst odsekov genoma, v katerih se nahaja devetnajst genov. Ti so bili preverjeni na neodvisnih podatkih iz literature. Le sedem genov je bilo predhodno povezanih s povišanim tveganjem za pojav Alzheimerjeve bolezni.

Zaradi nizkega števila udeležencev, frekvenc alelov ApoE pri bolnikih z verjetno Alzheimerjevo boleznijo ni bilo možno določiti. V prihodnosti bi morali analizo ponoviti z večjim vzorcem. V integratomski analizi smo dobili kandidatne gene, ki bi jih morali potrditi s pomočjo genotipizacije pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo in zdravih kontrolah. Zanimivo bi bilo tudi, da se v analizo vključi dodatne raziskave, ki niso asociacijske študije celotnega genoma.

**Ključne besede:** demenca, blaga kognitivna motnja, subjektivna kognitivna pritožba, apolipoprotein E, ApoE

# Abstract

Dementia is becoming ever-bigger problem as the population ages. 70 % of 47 million cases of dementia is attributed to Alzheimer's disease. Early onset Alzheimer's disease accounts for about 1 % to 5 % of all cases. This type of the disease is typically inherited in a mendelian fashion. The genetic component is much weaker in cases of late onset Alzheimer's disease. People with mild cognitive impairment usually have troubles with cognition but these troubles do not affect their everyday life. People with this diagnosis carry a higher risk for the development of Alzheimer's disease. If a person notices a decline in cognitive abilities, although the clinical tests do not show it, a person is diagnosed with subjective cognitive complaint. The risk for developing dementia that people with subjective cognitive complaint carry is still not known. More than 20 genes were already found to probably affect the risk of developing late onset Alzheimer's disease. The apolipoprotein E (ApoE) gene had the strongest association. From the three alleles, ApoE E4 is associated with higher risk for Alzheimer's disease, with 3 times higher risk in heterozygotes ApoE E4/- and 8 to 12 times higher risk in homozygotes ApoE E4/E4, compared to homozygotes ApoE E3/E3. In our project, we formed two goals: I) assigning the frequencies of ApoE alleles in Slovene population of patients with Alzheimer's disease and II) finding new potential biomarkers in preexistent databases, which could be used for the diagnosis of possible Alzheimer's disease.

In the project, we included 113 patients, treated in the clinic of Center for cognitive impairments at the Department of neurology, University medical centre, Ljubljana. We took the blood from the patients and extracted from it the DNA. We also acquired their clinical data. Because of the low number of patients, diagnosed with Alzheimer's disease, we performed the analysis on patients, diagnosed with subjective cognitive complaint, mild cognitive impairment and cognitive decline. The three groups differed in age and results of cognitive tests, but not in the frequencies of ApoE genotypes and alleles. The genotyped population differed with statistical significance from general European population in the frequencies of ApoE genotypes.

To find new potential biomarkers, we collected preexisting genome wide association studies, performed on populations of Alzheimer's disease patients. We analyzed the results of these studies using an online tool Integratomics (<http://genepark.mf.uni-lj.si/integratomics/home>). The 13 regions, which shared the highest score, contained 19 genes. These were further verified in independent literature data. Of the 19 genes, only seven were described beforehand to have an association with the risk of Alzheimer's disease.

Because of a low number of participants, it was not possible to assess the frequencies of ApoE alleles in patients with Alzheimer's disease. In the future, we would need to repeat the analysis with a higher number of participants. The integratomic analysis resulted in a list of candidate genes, which should be verified in a follow up, consisting of a genotyping of patients with Alzheimer's disease and healthy controls. It would also be interesting to include additional non-genome wide association studies in the analysis.

**Keywords:** dementia, mild cognitive impairment, subjective cognitive complaint, apolipoprotein E, ApoE

# Kazalo

Seznam kratic .....	iv
Seznam tabel .....	v
1. Uvod .....	1
1.1. Alzheimerjeva bolezen .....	1
1.2. Dejavniki za razvoj Alzheimerjeve bolezni.....	2
1.3. Genetika Alzheimerjeve bolezni.....	3
2. Namen in hipoteze .....	6
3. Materiali in metode.....	7
3.1. Preiskovanci.....	7
3.2. Analiza genotipa Apolipoproteina E.....	8
3.2.1. Izolacija DNA.....	8
3.2.2. Preverjanje kakovosti DNA .....	8
3.2.3. Verižna reakcija s polimerazo.....	9
3.2.4. Statistična analiza .....	13
3.3. Integratomika .....	13
3.3.1. Zbiranje podatkov.....	14
3.3.2. Procesiranje podatkov.....	15
3.3.3. Statistična analiza in preverjanje rezultatov .....	15
4. Rezultati.....	17
4.1. Preiskovanci.....	17
4.2. Analiza genotipa Apolipoproteina E.....	19
4.3. Integratomika .....	23
5. Razprava .....	25
6. Zaključek.....	30
7. Literatura.....	31
Zahvala .....	36

## Seznam kratic

AB.....	Alzheimerjeva bolezen
ADAM10.....	Gen z zapisom za $\alpha$ -sekretazo
ApoE.....	Apolipoprotein E
APP.....	Amiloidni perkurzorski protein
A $\beta$ .....	Amiloid- $\beta$
A $\beta$ <sub>40</sub> .....	Amiloid- $\beta$ dolžine 40 aminokislin
A $\beta$ <sub>42</sub> .....	Amiloid- $\beta$ dolžine 42 aminokislin
BKM.....	Blaga kognitivna motnja
C.....	Cistein
CST.....	Cerebro-spinalna tekočina
DNA.....	Deoksiribonukleinska kislina
EDTA.....	Dietilendiamintetraocetna kislina
ITM.....	Indeks telesne mase
KPSS.....	Kratek preizkus spoznavnih sposobnosti
MoCA.....	Montrealska lestvica spoznavnih sposobnosti
PAB.....	Pozna oblika Alzheimerjeve bolezni
PCR.....	Verižna reakcija s polimerazo
qPCR.....	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
R.....	Arginin
RNA.....	Ribonukleinska kislina
SKP.....	Subjektivna kognitivna pritožba
T <sub>m</sub> .....	Temperatura taljenja DNA
ZAB.....	Zgodnja oblika Alzheimerjeve bolezni

## Seznam tabel

Tabela 1: Možne kombinacije genotipov in talilnih temperatur (MOLBIOL, 2017).....	12
Tabela 2: Sestava ene vdolbinice na plošči. ....	12
Tabela 3: Program za Light Cycler, uporabljen za genotipizacijo ApoE.....	12
Tabela 4: Pregled asociacijskih študij celotnega genoma, katerih podatki so bili uporabljeni v metaanalizi. ....	15
Tabela 5: Razdelitev bolnikov glede na diagnozo.....	17
Tabela 6: Značilnosti treh uporabljenih diagnoz pri zbranih kliničnih in laboratorijskih podatkih (N=74). ....	18
Tabela 7: Rezultati analize čistosti DNA. ....	19
Tabela 8: Število in frekvenca posameznih genotipov znotraj analiziranih diagnoz. ....	19
Tabela 9: Frekvence posameznih alelov znotraj analiziranih diagnoz. ....	19
Tabela 10: Občutljivost in specifičnost genotipov ApoE E4/E4 in ApoE E4/- za tri analizirane diagnoze. ....	20
Tabela 11: Podatki iz baze ExAC za genotipa ApoE E4 in ApoE E2.....	20
Tabela 12: Rezultati Shapirovega testa za numerične spremenljivke. ....	21
Tabela 13: Rezultati t-testa. ....	22
Tabela 14: Rezultati Mann-Whitneyevega U testa.....	22
Tabela 15: Odseki z najvišjim rezultatom v integratonski analizi. ....	24
Tabela 16: Razširjenost alela ApoE E4 in genotipa ApoE E4/E4 pri različnih populacijah.....	26





# 1. Uvod

## 1.1. Alzheimerjeva bolezen

Demenca je sindrom, za katerega je značilen upad kognitivnih funkcij (McKhann idr., 1984). Na svetu naj bi bilo, v letu 2015, že približno 47 milijonov ljudi diagnosticiranih z neko obliko demence, od katerih jih je približno 70 % uvrščenih pod diagnozo Alzheimerjeve bolezni (AB). Med osebami, starejšimi od 85 let, že vsaka tretja spada med diagnosticirane (Shao, Peng, & Wang, 2017; Wimo idr., 2014). Do leta 2050 bo število bolnikov z demenco na svetu verjetno naraslo na več kot 131 milijonov ljudi, od katerih jih bo več kot 70 % diagnosticiranih v državah v razvoju (Kalarija idr., 2008; Shao idr., 2017). V letu 2010 so bile, v svetovnem merilu, za skrb v povezavi z demenco namenjene 604 milijarde \$. Največji delež predstavljajo stroški iz visoko razvitih držav (Wimo idr., 2014). Wimo idr. (2014) so ocenili razširjenost demence pri ljudeh, starejših od 60 let, znotraj območja razširjene Evropske unije. Za leto 2008 je za to območje predvidenih 7,82 milijona demenčnih, s katerimi je povezanih 167 milijarde € stroškov – povprečno 22,000 € na bolnika. 56 % stroškov je porabljenih za neformalno oskrbo, kar je še bolj izrazito v južni Evropi (Wimo idr., 2011).

V letu 2010 je bilo v Sloveniji skoraj 23,000 ljudi diagnosticiranih z demenco. Skupni stroški za vse vrste demenc so bili ocenjeni na 214,9 milijona € na leto (Bon idr., 2013).

Leta 1984 je izšel prvi izvod kriterijev za diagnozo AB. Bolezen je bila opisana kot progresivna motnja, ki se pojavi v poznem življenjskem obdobju. Avtorji so izhajali iz predpostavke, da sta patologija in klinični simptomi tesno povezana, torej oseba brez patologije ne bo imela simptomov in obratno. (Jack idr., 2011; McKhann idr., 1984). Kasnejše raziskave so pokazale, da lahko oseba patološko ustreza opisu AB, vendar ne kaže nobenih simptomov. Poleg tega se je v kasnejših različicah kriterijev uveljavila klasifikacija ljudi, ki ne dosegajo mejnih vrednosti patoloških sprememb, vendar že kažejo simptome, ki jih lahko opazijo oni sami ali pa njihovi bližnji (Jack idr., 2011). Novejši kriteriji za diagnozo ločijo med verjetno AB in verjetno AB z dokazi patofizioloških procesov, značilnih za AB. Za diagnozo verjetne AB mora pacient dosegati tudi kriterije za diagnozo demence. To pomeni, da mora imeti kognitivne simptome, ki vplivajo na njegovo vsakdanje življenje in jih ni mogoče pripisati psihiatričnim motnjam. Upad kognicije mora biti potrjen tudi preko objektivnih testov kognicije in mora biti prisoten v vsaj dveh domenah (npr. pomnjenju, vizualno-prostorskih zmožnostih, jezikovnih zmožnostih). Poleg tega je za diagnozo verjetne AB značilno, da upad kognicije napreduje počasi in ga ni mogoče pripisati cerebrovaskularni bolezni, drugi demenci, afaziji, nevrološkem obolenju ali komorbidnosti. Kognitivni upad je lahko dveh vrst: amnestični tip upada prizadene pomnjenje in je najpogostejši, medtem ko neamnestični tip upada vpliva na druge funkcije, kot na primer jezik in vizualno-prostorske zmožnosti. Pozitivni testi za biološke označevalce, ki veljajo za dokaz prisotnosti patofiziološkega procesa AB, dodatno podkrepijo diagnozo. Ti biološki označevalci lahko odražajo količino možganskega amiloida- $\beta$  ali stopnjo degeneracije nevronov (McKhann idr., 2011).

AB lahko glede na genetsko komponento ločimo na dva tipa – družinsko ali zgodnjo obliko AB (ZAB) in pozno obliko AB (PAB). Pod ZAB uvrščamo približno 1 % do 5 % primerov AB. Za to obliko bolezni je značilno, da se pojavi pred 65. letom starosti in napreduje veliko bolj agresivno, medtem ko je za PAB značilno, da se pojavi šele po 65. letom starosti. Za ZAB je značilna tudi mendelska oblika dedovanja, pri čemer se večina mutacij prenaša avtosomalno dominantno in ima visoko raven penetrance. PAB, po drugi strani, pa lahko klasificiramo med multifaktorske bolezni. Na razvoj multifaktorskih bolezni sočasno vpliva več dednih dejavnikov, kot tudi dejavnikov okolja. Genetska komponenta je tako pri PAB šibkejša in znane mutacije se ne dedujejo v

mendelski obliki. Vseeno raziskave na dvojčkih kažejo, da genetska komponenta pripomore od 60 % do 80 % k razvoju PAB (Maver, 2016; Reitz & Mayeux, 2014).

Definicija blage kognitivne motnje (BKM) je bila uveljavljena za klasifikacijo oseb med AB in zdravim staranjem. Na začetku so se osredotočali le na težave s pomnjenjem, kasneje pa so jo razširili še na druga področja kognicije. Ljudje z BKM, ki imajo težave s pomnjenjem, so uvrščeni pod BKM amnestičnega tipa, medtem ko so ljudje s težavami na drugih področjih kognicije in brez težav s pomnjenjem uvrščeni pod BKM neamnestičnega tipa. Osebe z BKM amnestičnega tipa, ki preidejo v demenco, navadno razvijejo AB ali vaskularno demenco, medtem ko osebe z BKM neamnestičnega tipa navadno preidejo v frontotemporalno demenco ali demenco z Lewyjemi telesci. Da je oseba uvrščena pod diagnozo BKM, mora imeti občutek slabše zmogljivosti na enem ali več področjih kognicije, kar mora biti potrjeno s strani kliničnih testov, hkrati pa mora oseba še vedno normalno delovati v vsakdanjem življenju (Petersen idr., 2014; Sanford, 2017). Pojavnost BKM pri osebah, starejših od 65 let, se giblje med 3 % in 22 % (Campbell, Unverzagt, LaMantia, Khan, & Boustani, 2013; Sanford, 2017). Tako velike razlike med ocenami pojavnosti izhajajo iz različnih populacij, vključenih v raziskave, in neenotne definicije BKM. 30 % do 50 % primerov BKM ob naslednjem pregledu preide nazaj v stanje normalne kognicije, vendar hkrati 5 % do 10 % primerov na leto preide v demenco, kar je znatno višje od 1 % do 2 % v zdravi populaciji (Sanford, 2017).

Subjektivna kognitivna pritožba (SKP) se je uveljavila kot dodatna stopnja pri razvoju AB, pred prehodom v BKM. Na tej stopnji oseba opaža zmanjšanje kognitivne zmogljivosti, vendar klinični testi ne kažejo nobenih znakov bolezni. Zdi se, da je populacija s SKP veliko bolj nagnjena h kognitivnemu upadu. Rezultati raziskav v katerih so poskusili najti povezavo med rezultati testov kognicije in SKP so bili mešani, čeprav v večini rezultati kažejo na upad kasneje v življenju (Garcia-Ptacek idr., 2016).

Za AB je značilen nastanek dveh proteinskih agregatov v možganih. Amiloidni plaki so sestavljeni iz amiloida beta ( $A\beta$ ), medtem ko so nevrofibrilarne pentlje sestavljene iz nenormalno fosforiliranega, z mikrotubuli povezanega, proteina tau (Bagyinszky, Youn, An, & Kim, 2014; Ono, 2017; Pierce, Bullain, & Kawas, 2017).  $A\beta$  nastane pri posttranslacijski cepitvi amiloidnega perkurzorskega proteina (APP) na dveh mestih. Od vseh različic proteina je najbolj pogost protein dolžine 40 aminokislin ( $A\beta_{40}$ ), z AB pa je povezana različica  $A\beta$  dolžine 42 aminokislin ( $A\beta_{42}$ ), ki je tudi bolj nagnjena k agregaciji. Agregati obstajajo v obliki manjših oligomerov, protofibril in fibril, od katerih so najbolj toksični oligomeri (Ono, 2017). Zaradi agregacije v osrednjem živčnem sistemu je koncentracija  $A\beta_{42}$  v cerebro-spinalni tekočini (CSF) pri bolnikih z AB nižja (Albert idr., 2011; Reitz & Mayeux, 2014). Funkcija proteina tau je stabilizacija mikrotubulov, vendar ob fosforilaciji disociira in tvori parne vijačne strukture. Obenem mikrotubuli razpadejo, kar prekine celični transport (Bagyinszky idr., 2014). Pri pacientih z AB je količina tau in fosforiliranega tau v CSF povišana (Reitz & Mayeux, 2014). Količina tau v CSF med drugim tudi odraža poškodbe možganskih nevronov (Albert idr., 2011). Pri bolnikih z BKM znižana koncentracija  $A\beta$  in povišana koncentracija tau v CSF korelirata s prehodom iz BKM v AB (Sanford, 2017).

### 1.2. Dejavniki za razvoj Alzheimerjeve bolezni

Dejavniki za razvoj BKM vključujejo starost, moški spol, prisotnost ApoE E4 alela in prisotnost BKM v ožji družini. Odsotnost ApoE E4 alela, kot tudi višji rezultati pri testiranju kognicije in večji volumen hipokampusa, so statistično pomembno povezani s prehodom nazaj v normalno kognicijo. Vpliv na razvoj BKM imajo tudi vaskularna obolenja, kot sta na primer hipertenzija in hiperlipidemija, in druga obolenja, kot sta na primer depresija in sladkorna bolezen. Poleg

nespremenljivih dejavnikov in obolenj, igra pomembno vlogo kot dejavnik za razvoj BKM tudi pomanjkanje fizične in mentalne aktivnosti. Med dejavnike, na katere imamo vpliv, spada velik nabor zdravil, znižanje krvnega tlaka, depresija, metabolen sindrom in spremembe v čutih, kot na primer oslabitev vida ali sluha. Depresija med drugim poviša tveganje za prehod iz BKM v demenco (Campbell idr., 2013; Sanford, 2017).

Barnes in Yaffe (2011) sta v metaanalizi raziskav dejavnikov za razvoj AB prišla do zaključka, da lahko polovico primerov AB potencialno pripišemo sedmim negenetskim dejavnikom: diabetes, hipertenzija, prekomerna telesna teža, depresija, fizična neaktivnost, kajenje in kognitivna neaktivnost (Barnes & Yaffe, 2011).

Čeprav se je že v več raziskavah pokazala povezava med diabetesom tipa 2 in povišano možnostjo za nastanek AB, mehanizem, preko katerega bi to bilo možno, še ni znan. Diabetes je sicer povezan tudi s povišano možnostjo infarkta, kar lahko oslabi krvno-možgansko pregrado (Barnes & Yaffe, 2011; Reitz & Mayeux, 2014).

Vpliv hipertenzije na možnost pojava AB se spreminja s starostjo. V srednjem življenjskem obdobju povišan krvni tlak poveča tveganje za pojav AB kasneje v življenju, medtem ko je v poznem življenjskem obdobju s povišanim tveganjem za razvoj AB povezana hipotenzija (Barnes & Yaffe, 2011; Reitz & Mayeux, 2014).

Barnes in Yaffe (2011) sta v metaanalizi preučila rezultate raziskav, ki preučujejo vpliv prekomerne telesne teže na tveganje za pojav AB, in prišla do zaključka, da prekomerna telesna teža poviša tveganje za razvoj AB v srednjem življenjskem obdobju, medtem ko v poznem življenjskem obdobju deluje zaščitno. V poznem življenjskem obdobju tveganje za razvoj AB zvišuje prenizka telesna teža (Barnes & Yaffe, 2011; Reitz & Mayeux, 2014). Poleg tega mediteranska dieta zniža možnost za pojav AB, neodvisno od fizične aktivnosti in vaskularnih dejavnikov (Reitz & Mayeux, 2014).

Pomanjkanje fizične aktivnosti in kajenje povečujeta tveganje za razvoj AB. Vzpostavitev športne aktivnosti pri starejših izboljša njihove kognitivne funkcije. Obenem pa so do sedaj poskusi raziskovanja povezave med fizično aktivnostjo in demenco prišli do nasprotujočih si zaključkov – bodisi dveh dejavnikov niso uspeli povezati, bodisi je bila fizična aktivnost povezana z zmanjšanjem tveganja za demenco. Povečano tveganje za nastanek AB imajo trenutni kadilci, ne pa bivši kadilci (Barnes & Yaffe, 2011; Reitz & Mayeux, 2014).

Barnes in Yaffe (2011) pod kognitivno neaktivnost združujeta nižjo stopnjo izobraženosti, nižje doseženo delovno mesto, nižji inteligenčni kvocient in odsotnost aktivnosti, ki stimulirajo možgane. Glede na to, da je na svetu 40 % ljudi z nizko stopnjo izobrazbe, je kognitivna neaktivnost zelo pomemben negenetski dejavnik za razvoj AB (Barnes & Yaffe, 2011). V nekaterih skupnostih držav v razvoju je kar do 80 % starejših nepismenih, kar predstavlja dodatno težavo tudi za diagnostične procese, saj se nekateri testi kognitivnih funkcij nanašajo na bolnikovo sposobnost branja (Kalaria idr., 2008).

### 1.3. Genetika Alzheimerjeve bolezni

Pri bolnikih z ZAB so bile najdene mutacije v treh genih – APP, presenilin 1 in presenilin 2 (Karch, Cruchaga, & Goate, 2014; Reitz & Mayeux, 2014; Verheijen & Sleegers, 2018). Najpogosteje mutiran gen pri ZAB je presenilin 1 (približno 80 % primerov ZAB), nato APP (približno 14 % primerov ZAB) in nazadnje presenilin 2 (približno 5 % primerov ZAB). APP se nahaja na kromosomu 21 in vsebuje zapis za transmembranski protein. Večina do sedaj znanih mutacij v tem genu se nahaja okoli domene z zapisom za A $\beta$  in vpliva na procesiranje APP, s čimer spodbuja nastanek fragmenta A $\beta$ <sub>42</sub>. Zaradi trisomije kromosoma 21, APP predstavlja povišano tveganje za

razvoj AB pri bolnikih z Downovim sindromom. Slednje je podprto tudi s primeri oseb, ki imajo povišano število kopij APP. Presenilin 1 in presenilin 2 vsebujeta zapis za podenoti  $\gamma$ -sekretaze – encima, udeleženega v procesiranju APP. Mutacije v presenilinu 1 spremenijo njegovo aktivnost in spodbujajo nastanek daljših oblik A $\beta$ , kar spremeni razmerje A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> (Karch idr., 2014; Pimenova, Raj, & Goate, 2018; Shao idr., 2017).

Tudi pri PAB je genetski vidik bolezni zelo pomemben. Osebe z vsaj enim bolnikom s PAB v ožji družini imajo relativno tveganje enako od 3,5 do 7,5, odvisno od števila obolelih sorodnikov (Cuyvers & Sleegers, 2016). Genetski dejavniki za razvoj PAB svojega vpliva ne izražajo po mendelskem dedovanju. Nosilci teh genetskih dejavnikov imajo povišano možnost za razvoj bolezni (Reitz & Mayeux, 2014).

Za vse multifaktorske bolezni je značilno, da na nastanek bolezni vpliva več dednih dejavnikov. Klasični model multifaktorskih bolezni predpostavlja, da imajo ti dedni dejavniki sami po sebi majhen vpliv na bolezen. Vendar se je po vzpostavitvi tega modela izkazalo, da lahko do multifaktorske bolezni vodijo tudi posamezni redki dedni dejavniki, ki imajo na bolezen velik vpliv. Klasični pristop k iskanju genov, ki vplivajo na razvoj multifaktorskih bolezni, se je opiral na kandidatne gene. Moč tega tipa iskanja genov je majhna, zato raziskave na tem področju niso imele večjega napredka, vse do razvoja visoko zmogljivih metod v genetiki in objave zaporedja človeškega genoma. Nova tehnologija je omogočila preiskovanje sprememb povezanih z boleznijo na nivoju celotnega molekularno-biološkega nivoja (npr. genoma, epigenoma, transkriptoma, proteoma), brez uporabe vnaprej postavljene hipoteze. To pomeni, da ne potrebujemo vnaprej znanih kandidatnih sprememb, da bi lahko opravili raziskavo. Nove metode, kot na primer asociacijske študije celotnega človeškega genoma, so s seboj prinesle višjo ločljivost in večjo moč pri odkrivanju dednih dejavnikov, ki vplivajo na razvoj multifaktorskih bolezni (Maver, 2016).

V asociacijskih študijah celotnega človeškega genoma, narejenih na populacijah bolnikov s PAB, je bilo najdenih že več kot dvajset genov, povezanih s tem tipom bolezni, od katerih je najmočnejšo povezavo s PAB imel gen z zapisom za Apolipoprotein E (ApoE). ApoE ima tri alele (E2, E3 in E4), ki se med seboj razlikujejo na dveh mestih v zaporedju. Kar 50 % bolnikov z AB je nosilec ApoE E4. Heterozigoti ApoE E4/- imajo napram homozigotom ApoE E3/E3 možnost za razvoj AB povečano 3-krat, medtem ko je tveganje pri homozigotih ApoE E4/E4 kar od 8 do 12-krat povišano. Obenem je starost ob pojavu bolezni negativno povezana z dozo ApoE E4 alela, saj vsak alel ApoE E4 zmanjša starost ob pojavu bolezni od 7 let do 9 let (Cuyvers & Sleegers, 2016; Karch idr., 2014; Liu, Kanekiyo, Xu, & Bu, 2013; Michaelson, 2014).

Mutacije v genu z zapisom za  $\alpha$ -sekretazo (ADAM10) so bile povezane z nekaterimi družinami s PAB.  $\alpha$ -sekretaza je encim, ki cepi APP med njegovim procesiranjem (Karch idr., 2014). Raziskave na miših tudi kažejo, da povišano izražanje ADAM10 zniža raven A $\beta$  v osrednjem živčnem sistemu (Wetzels, Seipold, & Saftig, 2017).

ApoE je 34 kDa velik protein, ki je udeležen v homeostazo holesterola. V perifernem tkivu so glavni vir ApoE jetra, v osrednjem živčnem sistemu pa imajo to vlogo astrociti. Po poškodbi je izražanje ApoE povečano. V takem scenariju spodbuja preživetje nevronov. Sestavljen je iz dveh domen. Prva je vezavna domena za receptorje lipoproteinov z nizko gostoto, druga pa vsebuje vezavno mesto za lipide. V primeru ApoE E2 in ApoE E3 domeni med seboj ne interagirata, medtem ko sta v primeru ApoE4 med seboj povezani. ApoE preko interakcije z receptorji ApoE prenaša holesterol do nevronov. Med drugim interagira tudi z A $\beta$  in ga čisti iz zunajceličnega prostora. Alel ApoE E4 ne odstranjuje A $\beta$  tako učinkovito kot ApoE E3, kar naj bi bilo delno zaradi njegove zaprte konformacije. Alel ApoE E4 je hkrati tudi hitreje razgrajen preko ApoE receptorjev. Tako pri bolnikih z AB, kot tudi pri zdravih osebah, je povezan s povišanim nalaganjem fibrilarnega A $\beta$ , znižano ravnjo A $\beta$ <sub>42</sub> v CST, hkrati pa pripomore k tveganju za razvoj AB tudi

preko interakcije s pridruženimi motnjami, kot so ateroskleroza, diabetes in vaskularna obolenja. Zdravim osebam z ApoE E4 alelom se debelina korteksa in volumen hipokampusa hitreje zmanjšujeta, kar se odraža tudi pri njihovem hitrejšem upadu kognitivnih sposobnosti, povezanih s spominom (Liu idr., 2013; Michaelson, 2014; Pimenova idr., 2018; Shao idr., 2017).

## 2. Namen in hipoteze

Do leta 2050 lahko pričakujemo, da se bo število oseb z demenco povečalo na več kot 131 milijonov ljudi. Najpogostejši tip demence je AB, za katero je značilno napredovanje kognitivnega upada (Shao idr., 2017). Diagnoza AB je postavljena šele po manifestaciji simptomov (Profenno, Porsteinsson, & Faraone, 2010). Zgodnje diagnosticiranje ni pomembno le za boljše pogoje pri poskusu zdravljenja bolezni, temveč tudi pri svetovanju bolniku glede življenjskega stila, ki najbolje preprečuje napredovanje bolezni, in načrtovanju nege. Dolgoročno sposobnost odkritja AB v predklinični fazi omogoča tudi vzpostavitev kliničnih poskusov potencialnih zdravil v fazi razvoja bolezni, ko spremembe še niso znatne (Herukka idr., 2017).

Večino primerov AB uvrščamo pod PAB, ki je multifaktorska bolezen. To pomeni, da na razvoj bolezni vpliva več dednih dejavnikov, ki imajo sami po sebi na razvoj bolezni le majhen vpliv (Maver, 2016).

Genotip ApoE je najbolj razširjen genetski označevalec AB (Michaelson, 2014). Genotipizacija ApoE je že bila izvedena v več raziskavah, pri čemer so se pojavnosti alela ApoE E4 in genotipa ApoE E4/E4 med populacijami razlikovale. Znotraj Evrope so bile najvišje pojavnosti opažene na severu, medtem ko so pojavnosti najnižje v državah ob Mediteranu (Ward idr., 2012). Frekvenca alela ApoE E4 je v populaciji z AB povišana v primerjavi z zdravo populacijo (Liu idr., 2013). V Sloveniji genotipizacija ApoE pri bolnikih z AB še ni bila izvedena, zato je opredelitev tveganja za AB v slovenski populaciji nemogoča. Temu primerno se v prvem delu naloge osredotočamo na genotipizacijo ApoE v slovenski populaciji bolnikov z AB.

Glede na to, da je le 50 % bolnikov s PAB nosilcev alela ApoE E4, poskušamo v drugem delu naloge razširiti nabor potencialnih genetskih označevalcev verjetne AB, z uporabo algoritma za integracijo rezultatov visoko zmogljivih tehnik. Z algoritmom želimo integrirati rezultate že obstoječih asociacijskih študij celotnega genoma in tako iz že objavljenih podatkov izluščiti redkejša dedna dejavnika za razvoj verjetne AB.

Cilji magistrske naloge so sledeči:

1. določiti frekvence alelov ApoE pri bolnikih z AB v Sloveniji,
2. najti nove potencialne biološke označevalce v že obstoječih podatkovnih zbirkah, ki bi jih bilo možno uporabiti pri diagnosticiranju AB.

Glede na cilja so bile hipoteze sledeče:

1. frekvence genotipov ApoE se ne razlikujejo statistično pomembno od frekvenc genotipov v evropski populaciji bolnikov z verjetno AB,
2. z metaanalizo bomo opredelili širši nabor potencialnih bioloških označevalcev verjetne AB, od katerih so bili nekateri že potrjeni v neodvisnih študijah, drugi pa predstavljajo nove kandidatne označevalce.

## 3. Materiali in metode

### 3.1. Preiskovanci

Preiskovance predstavljajo bolniki, obravnavani v ambulantah Centra za kognitivne motnje na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, Nevrološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Pred odvzemom venske krvi je nevrolog preiskovance seznanil s potekom in cilji raziskave, zatem pa je bila pridobljena informirana privolitev za sodelovanje v raziskavi (dodatek 1). Preiskovancem je nato medicinska sestra odvzela 10 mL venske krvi v z EDTA prevlečeno epruveto. Na epruveto je bila nalepljena nalepka z edinstveno številko. V zvezek je bilo zapisano, katera številka pripada specifičnemu preiskovancu, obenem pa je bil zabeležen tudi datum odvzema vzorca. Epruveta s krvjo je bila shranjena pri +4 °C. Kri je bila nato prenesena na Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Tam je bila vzorcu dodeljena laboratorijska koda, nato pa je bil vzorec vnesen v podatkovno bazo. Vzorec je bil nato shranjen pri –80 °C.

Ostali klinični podatki preiskovancev so bili vneseni v tabelo Microsoft Excel, v katero so bili kasneje dodani tudi rezultati analize porazdelitve frekvenc genotipov Apolipoproteina E. Klinični podatki, uporabljeni v raziskavi, so bili:

- spol,
- starost,
- rezultati Kratkega preizkusa spoznavnih sposobnosti (KPSS),
- rezultati Montrealske lestvice spoznavnih sposobnosti (MoCA),
- ocene rezultatov slikanja možganov:
  - prisotnost atrofije hipokampusa,
  - prisotnost atrofije korteksa,
  - prisotnost atrofije bele možganovine,
- rezultati laboratorijskih preiskav CST:
  - koncentracija glukoze,
  - koncentracija proteinov,
  - koncentracija laktata,
  - količina levkocitov,
  - količina nevtralnih granulocitov,
  - količina limfocitov,
  - količina monocitov,
  - količina eritrocitov,
  - koncentracija proteina tau,
  - koncentracija fosforiliranega proteina tau,
  - koncentracija A $\beta$  v CST,
- rezultati krvnih preiskav:
  - koncentracija folne kisline,
  - koncentracija vitamina B12,
  - koncentracija glukoze,
  - koncentracija proteinov,
  - koncentracija feritina,
  - koncentracija holesterola,
  - koncentracija lipoproteina nizke gostote,
  - koncentracija lipoproteina visoke gostote,

- pridružene motnje:
  - prisotnost arterijske hipertenzije,
  - prisotnost sladkorne bolezni,
  - prisotnost vaskularne levkopatije,
  - prisotnost razpoloženske motnje,
  - prisotnost anksiozno-depresivne motnje,
  - prisotnost sindroma fibromialgije,
  - prisotnost hiperlipidemije,
- diagnoza.

### 3.2. Analiza genotipa Apolipoproteina E

#### 3.2.1. Izolacija DNA

Izolacija DNA je bila opravljena iz belih krvničk s pomočjo komercialnega kompleta »DNA Isolation Kit for Mammalian Blood« (Roche, Basel, Švica). Limfociti predstavljajo približno 0,3 % populacije krvnih celic. S komercialnim kompletom najprej liziramo eritrocite in jih pri tem ločimo od limfocitov. Te nato liziramo s pomočjo detergenta, oborimo in odstranimo proteine, DNA pa izoliramo z obarjanjem v etanolu (Roche, 2017).

Kri je bila segreta na +22 °C s pomočjo vodne kopeli. Zatem je bila razdeljena na dva 1,5-mL alikvota in en 3-mL alikvot. 1,5-mL alikvota sta bila shranjena v krioviali pri –80 °C, kot rezerva v primeru neuspešne izolacije, 3-mL alikvot pa je bil prestavljen v centrifugirko in uporabljen za izolacijo z uporabo sledečega protokola:

- 3 mL krvi dodamo 9 mL puфра za lizo eritrocitov (*»Red Blood Cell Lysis Buffer«*) in inkubiramo 10 min, na obračalnem stresalniku na 34 vrt./minuto.
- 10 min centrifugiramo na 875 g, nato pa odstranimo jasen, rdeč supernatant.
- Bel pelet zmešamo na vibracijskem mešalu dokler se ne resuspendira v preostanku supernatanta.
- Dodamo 1,5 mL puфра za lizo belih krvničk (*»White Cell Lysis Buffer«*) in zmešamo na vibracijskem mešalu dokler raztopina ne postane jasna temnordeča.
- Dodamo 50 µg RNaze in inkubiramo za 30 min pri +37 °C.
- Dodamo 780 µL raztopine za precipitacijo proteinov (*»Protein Precipitation Solution«*) in zmešamo na vibracijskem mešalu 25 s.
- Centrifugiramo 10 min na 12.000 g, nato pa zavržemo pelet in ohranimo supernatant.
- Dodamo dvakratni volumen etanola glede na supernatant, premešamo z obračanjem in centrifugiramo 10 min na 875 g.
- Supernatant zavržemo, dodamo 3 mL 70-odstotnega etanola, ohlajenega na +4 °C, premešamo z obračanjem in centrifugiramo 10 min na 875 g. Ta korak ponovimo.
- Odstranimo supernatant in posušimo pelet.
- Dodamo 400 µL puфра TE, pH 8,0 in zmešamo na vibracijskem mešalu.
- Inkubiramo 30 min pri +65 °C in hkrati zmešamo na vibracijskem mešalu vsakih 10 min.

#### 3.2.2. Preverjanje kakovosti DNA

Svetloba je sestavljena iz fotonov s specifično energijo. Ko v spektrofotometriji apliciramo svetlobo na vzorec, biomolekule izmenjajo energijo s svetlobo. Ob absorpciji energije preidejo elektroni v biomolekuli iz »osnovnega stanja« v »vzbujeno stanje«, pri čemer mora imeti foton natančno toliko energije, kot jo elektron potrebuje za prehod. Ob preskoku nazaj v »osnovno



stanje« elektron odda energijo v obliki fotona. Spektrofotometer meri ti interakciji med svetlobo in vzorcem. Iz podatka o izmenjani energiji lahko sklepamo na strukturne informacije o molekuli. Strukturni elementi, ki absorbirajo svetlobo, se imenujejo kromofori in dajejo biomolekuli sposobnost absorpcije svetlobe pri določeni valovni dolžini (Gault & McClenaghan, 2009). Spektrofotometer meri intenziteto svetlobe, spuščene skozi vzorec. Ker lahko svetlobo absorbira tudi uporabljen pufer, moramo vedno primerjati rezultat meritve vzorca ( $I$ ) z rezultatom negativne kontrole ( $I_0$ ), za katero navadno uporabimo pufer brez prisotnosti vzorca. Razmerje med intenzitetama vzorca in kontrole se imenuje transmitanca ( $T$ ) in je izračunana po sledeči formuli:

$$T = I/I_0 \quad (1)$$

V večini primerov uporabe spektrofotometrije pa ne uporabljamo transmitance, temveč absorbanco ( $A$ ), ki jo zlahka izračunamo iz transmitance po sledeči formuli:

$$A = -\log T \quad (2)$$

Obenem pa absorbanco lahko uporabimo za izračun koncentracije, saj je po Beer-Lambertovem zakonu absorbanca snovi odvisna od njene koncentracije v raztopini:

$$A_\lambda = \epsilon cl \quad (3)$$

V (3)  $A_\lambda$  predstavlja absorbanco pri določeni valovni dolžini. Ta je odvisna od ekstinkcijskega koeficienta snovi ( $\epsilon$ ), koncentracije snovi ( $c$ ) in dolžine poti, ki jo opravi svetloba skozi raztopino ( $l$ ). Razlike v valovni dolžini, pri kateri snov maksimalno absorbira svetlobo ( $A_{max}$ ), lahko izkoristimo za določanje stopnje kontaminacije v vzorcu. DNA in proteine zlahka ločimo med seboj, saj ima DNA  $A_{max}$  pri 260 nm, proteini pa pri 280 nm. DNA in RNA ločimo težje, saj moramo uporabiti enake valovne dolžine pri določanju absorbance (Gault & McClenaghan, 2009). Za preverjanje kakovosti izolirane DNA je bil uporabljen spektrofotometer NanoDrop™ (Thermo Scientific, Massachusetts, ZDA). Naprava je bila najprej kalibrirana z deionizirano vodo. Zatem je bila izmerjena negativna kontrola, ki jo je program uporabil pri kasnejših meritvah. Po negativni kontroli so bili izmerjeni vzorci. V vseh meritvah je bil uporabljen 1  $\mu$ L raztopine. Pri merjenju je bila odčitana absorbanca pri treh valovnih dolžinah: 230 nm (organske kontaminante), 260 nm (DNA) in 280 nm (proteini). Meritve so bile obenem uporabljene za določanje koncentracije DNA. Pri določanju stopnje kontaminacije sta bili izračunani razmerji  $A_{260}/A_{230}$  in  $A_{260}/A_{280}$ .

### 3.2.3. Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, uporabljena za pomnoževanje specifičnega dela DNA. Za izvedbo potrebujemo matrično DNA, ki jo želimo pomnoževati, toplotno stabilno DNA polimerazo, deoksiribonukleozid trifosfate v ekvimolarni količini, magnezij, začetne oligonukleotide in pufer. Metodo sestavljajo trije koraki – denaturacija, prileganje in podaljševanje. Ti trije koraki sestavljajo en cikel, ki se navadno ponovi od 25- do 40-krat. V koraku denaturacije uporabimo visoko temperaturo, s čimer ločimo verigi matrične DNA. Zatem moramo temperaturo v koraku prileganja znižati. S tem omogočimo prileganje začetnih oligonukleotidov na matrično DNA. Nato temperaturo ponovno dvignemo do točke, idealne za delovanje polimeraze. V koraku podaljševanja polimeraza podaljšuje začetne oligonukleotide, dokler ne nastane dvoverižna DNA. Opisane korake ponavljamo dokler ne dobimo dovolj velikega števila pomnoženih fragmentov.

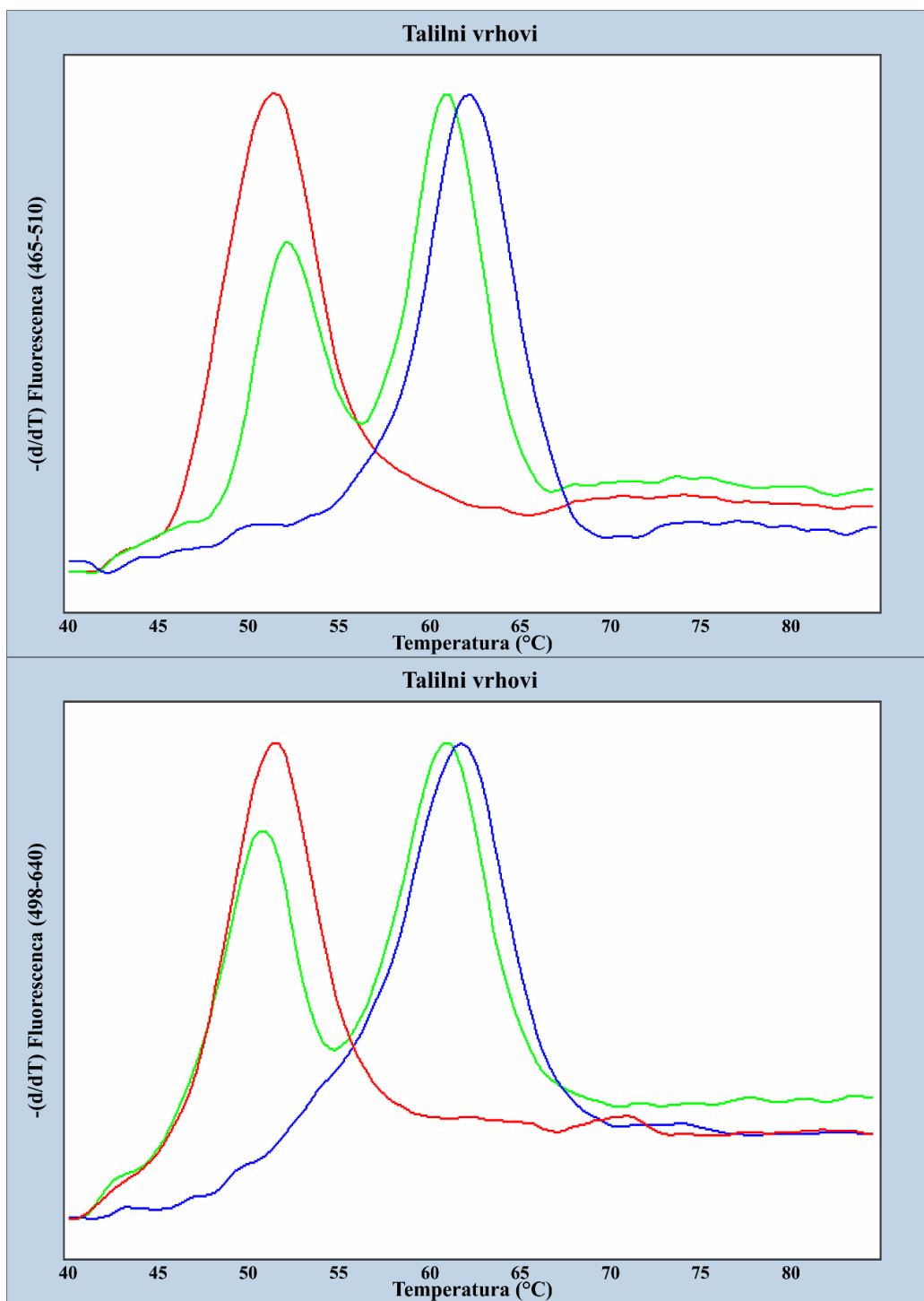
Optimalno v vsakem ciklu podvojimo količino matrične DNA, vendar se v resnici multiplikacijski faktor na cikel giblje okoli 1,6–1,7 (Jalali, Zaborowska, & Jalali, 2017; Mülhardt, 2007; Stephenson, 2016).

Na uspeh poskusa vpliva veliko dejavnikov – od kakovosti reagentov do matrične DNA. Dobro je imeti kakovostno matrično DNA. Čeprav je možno PCR izvesti z izredno majno količino DNA, je zaželeno imeti vsaj 10.000 molekul DNA v začetnem ciklu. Začetni oligonukleotidi morajo biti prilagojeni specifični reakciji. Navadno so začetni oligonukleotidi dolgi 18 bp–30 bp, vsebujejo 40 %–60 % gvanina in citozina in imajo talilno temperaturo pri 55 °C–80 °C. Talilna temperatura je v tem primeru temperatura, pri kateri je polovica dvoverižne DNA v enoverižni obliki. Klasično uporabljena polimeraza v PCR eksperimentih je Taq polimeraza. Izolirana je iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* in ima maksimalno aktivnost pri 74 °C in pH višjim od 8. Obstajajo tudi druge možnosti pri izbiri polimeraze, pri čemer ima vsaka svoje prednosti in slabosti. Za vse je značilno, da so toplotno stabilne, saj morajo ohranjati aktivnost tudi po večkratni izpostavitvi visoki temperaturi, doseženi med denaturacijo. Eden od pomembnejših dejavnikov pri izbiri polimeraze je pogostost napak. Za vsako polimerazo je značilna stopnja vstavitve napačne baze (različne od komplementarne bazi na matrični DNA). Pri polimerazah z zmožnostjo popravljanja napak, s pomočjo eksonukleazne aktivnosti, se napaka zgodi enkrat na  $10^6$  vstavljenih baz, medtem ko lahko pričakujemo pri polimerazah brez te aktivnosti povišanje stopnje napak za faktor 10 (Mülhardt, 2007; Stephenson, 2016).

Kvantitativni PCR (qPCR) nam omogoča merjenje količine DNA med pomnoževanjem. Najbolj enostaven princip za doseg tega je z uporabo barvila, ki se je sposobno nespecifično vezati v dvoverižno DNA, ob čemer začne fluorescirati (Jalali idr., 2017). Količino DNA lahko merimo tudi z uporabo oligonukleotidov s fluoroforom. Z uporabo dveh različnih fluoroforov lahko izkoristimo princip prenosa energije z resonanco fluorescence. Za prenos energije je ključno, da en od fluoroforov lahko sprejme svetlobo, ki jo odda drug fluorofor. Do sprejema pride, ko sta fluorofora dovolj blizu. Tri različne oblike kvantifikacije s principom prenosa energije z resonanco fluorescence so v uporabi. Prva, imenovana »TaqMan«, ima oba fluorofora na enem kratkem oligonukleotidu. Med fazo podaljševanja oligonukleotidi, vezani na matrično DNA, razpadejo ob stiku s polimerazo. Ob tem se oba fluorofora sprostita in energija med njima se ne prenaša več, zaradi česar se oddana svetloba, ki jo merimo, spremeni. Druga oblika implementacije je imenovana »molekulski svetilniki«. Tudi v tem primeru sta fluorofora vezana na isti oligonukleotid, vendar je ta daljši in sposoben tvoriti lasnico. Tako sta fluorofora dovolj blizu za prenos energije med njima samo v primeru, ko oligonukleotid ni vezan na DNA. Ob stiku s polimerazo tak oligonukleotid ne razpade, temveč samo disociira z DNA. Pri tretji implementaciji, imenovani »hibridizacijske sonde«, se fluorofora nahajata na različnih oligonukleotidih, na takih mestih, da se ob vezavi obeh oligonukleotidov na DNA nahajata dovolj blizu za prenos energije med njima. Ko uporabljamo obliko kvantifikacije, pri kateri sta oba fluorofora vezana na isti oligonukleotid, merimo isti fluorofor, ki ga vzbujamo. Pri oblikah kvantifikacije s fluoroforoma na različnih oligonukleotidih merimo svetlobo, ki jo odda prejemnik pri prenosu energije med fluoroforoma (Mülhardt, 2007).

Za pomnoževanje in detekcijo je bil uporabljen kit LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche, Basel, Švica) in LightMix® Kit ApoE C112R R158C (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Nemčija) ter sistem za RTQ-PCR LightCycler® 480 (Roche, Basel, Švica). Začetni oligonukleotidi pomnožijo 228 bp dolg odsek gena ApoE, ki vsebuje obe mesti, na katerih se aleli med seboj razlikujejo. Količina DNA se meri na principu hibridizacijskih sond. Detekcija genotipa po fazi pomnoževanja poteka na dveh kanalih, pri čemer vsak kanal meri svojo sondo. Kodon 112 preverja sonda, ki jo merimo pri 530 nm, medtem ko sonda za preverjanje kodona 158 preverjamo pri 640

nm. Ker se spektra obeh sond prekrivata, je bila ob procesiranju uporabljena barvna kompenzacija, generirana s kitom »ColorCompensation kit 40-0318«. Slika 1 prikazuje primere talilnih krivulj pri obeh kanalih.



Slika 1: Primeri možnih talilnih krivulj pri obeh kanalih; rdeči krivulji imata  $T_m$  vrha pri približno 53 °C do 55 °C, modri krivulji imata  $T_m$  vrha pri približno 64 °C in zeleni krivulji vsebujeta dva vrha – enega pri približno 53 °C do 55 °C in drugega pri 64 °C.

## Materiali in metode

Glede na odčitano temperaturo vrha lahko določimo sestavo kodona pri obeh alelih. Če ima talilna krivulja en vrh, potem sta oba alela na poziciji, ki jo sonda preverja, enaka, če pa dobimo dva vrha, potem se alela na preverjeni poziciji razlikujeta. Iz kombinacij talilnih temperatur obeh kanalov lahko določimo, kakšen je genotip. Tabela 1 prikazuje vse možne kombinacije genotipov in z njimi povezane talilne temperature pri obeh kanalih (MOLBIOL, 2017).

Tabela 1: Možne kombinacije genotipov in talilnih temperatur (MOLBIOL, 2017).

Genotip	E2/E2	E2/E3	E2/E4	E3/E3	E3/E4	E4/E4
Aminokislina na mestu 112	C/C	C/C	C/R	C/C	C/R	R/R
<i>T<sub>m</sub></i> vrhov pri 530 nm [°C]	55	55	55/64	55	55/64	64
Aminokislina na mestu 158	C/C	C/R	C/R	R/R	R/R	R/R
<i>T<sub>m</sub></i> vrhov pri 640 nm [°C]	53	53/64	53/64	64	64	64

Pomnoževanje in detekcija sta bili izvedeni za plošči s 384 vdolbinicami. Poleg vzorcev so bile na ploščo nanese tudi tri pozitivne kontrole (oligonukleotidi, priloženi komercialnemu kompletu, z že vnaprej znanim rezultatom) in negativna kontrola – voda. Tabela 2 prikazuje vsebino vsake uporabljene vdolbinice na plošči. Tabela 3 prikazuje uporabljen program za Light Cycler (Roche, Basel, Švica).

Tabela 2: Sestava ene vdolbinice na plošči.

Komponenta	Količina [μL]
Voda	2,05
Raztopina 25 mM Mg <sup>2+</sup>	0,4
Raztopina z začetnimi oligonukleotidi in sondami	0,5
DMSO	0,3
Roche Master	0,5
Vzorec, kontrola ali voda	1,25
Končni volumen	5

Tabela 3: Program za Light Cycler, uporabljen za genotipizacijo ApoE.

Parametri	Denaturacija	Pomnoževanje			Taljenje			Hlajenje
Vrsta analize	Brez	Kvantifikacija			Talilna krivulja			Brez
Število ciklov	1	45			1			1
Temperatura [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Čas	10 min	5 s	10 s	15 s	30 s	2 min	0 s	30 s
Vrsta meritve	Brez	Brez	Enkratna	Brez	Brez	Brez	Neprekinjena	Brez
Število meritev [na °C]	-	-	-	-	-	-	1	-

Analiza talilnih krivulj je bila izvedena z Light Cycler<sup>®</sup> 480 programsko opremo (Roche, Basel, Švica). Vsak filter je bil analiziran posebej. Po izboru filtra je bila aktivirana barvna kompenzacija. Zatem je bila najprej izvedena analiza maksimuma drugega odvoda, nato pa so bili rezultati vizualizirani in izvoženi preko analize »Določanje temperatur taljenja DNA: (T<sub>m</sub>)«.

### 3.2.4. Statistična analiza

Klinični podatki, zbrani v dokumentu programa Microsoft Excel, so bili analizirani z uporabo programskega jezika Python 3.6.5. Celotna analiza je bila napisana v programskem okolju IPython (Perez & Granger, 2007). Za uvoz in procesiranje podatkov sta bila uporabljena paketa Pandas (McKinney, 2010) in NumPy (Oliphant, 2006). Za statistično analizo podatkov so bili uporabljeni testi v paketu SciPy (Jones, Oliphant, & Peterson, 2001).

Za kontrolo v primeru genotipov so bili uporabljeni podatki iz baze ExAC. V bazi so bili poiskani vnosi za manjše alele (ApoE E2 in ApoE E4). Podatki o številu in frekvencah so v bazi zavedeni v tabeli in obsegajo več različnih populacij. Uporabljeni so bili le podatki za evropsko populacijo, brez Finske. Iz števila homozigotov, števila manjših alelov in celotnega števila alelov so bili izračunani: število homozigotov manjšega alela, število heterozigotov z manjšim alelom in število oseb brez manjšega alela. Za primerjavo podatkov iz baze ExAC in rezultatov genotipizirane populacije je bil uporabljen Hi-kvadrat test.

V nadaljnji analizi so bile uporabljene le diagnoze, ki so vsebovale več kot petnajst vzorcev. Za vse diagnoze, vključene v analizo, sta bila izračunana specifičnost in občutljivost za prisotnost genotipa ApoE E4/E4 in prisotnost vsaj enega alela ApoE E4. Za analizo kategoričnih spremenljivk sta bila uporabljena Hi-kvadrat test in Fisherjev eksaktni test. Pred analizo numeričnih spremenljivk je bila s Shapirovim testom preverjena normalnost porazdelitve. Numerične spremenljivke z normalno porazdelitvijo so bile analizirane z uporabo t-testa. Za analizo numeričnih spremenljivk z nenormalno porazdelitvijo je bil uporabljen Mann-Whitneyev U test.

## 3.3. Integratomika

Razvoj tehnologije, ki nam omogoča avtomatsko in paralelno merjenje številnih bioloških molekul, je, skupaj z bioinformatičnimi orodji za analizo dobljenih podatkov, privedlo do metod, ki jim rečemo »omike«. Te metode so se od klasičnih razlikovale po tem, da so eksperiment, namesto hipotez, usmerjali podatki sami. To pomeni, da eksperimenta ne vodijo več hipoteze, osnovane na predhodnem znanju raziskovalca. S tem se izognemo predhodnemu posploševanju biološkega sistema (Amaro, Petretto, Angelini, & Pfeffer, 2016).

Omike lahko razdelimo v podskupine glede na tip osnovne molekule (npr. DNA, RNA, protein), ki jo preiskujejo (Yugi, Kubota, Hatano, & Kuroda, 2016). Omike se zanašajo na iskanje sprememb le na enem molekularnem nivoju, medtem ko v organizmu vsi molekularni nivoji medsebojno vplivajo en na drugega (Maver, 2016). Slaba stran omik je, da se pri osredotočanju na samo eno podskupino izgubijo informacije o medsebojnem vplivu osnovnih molekul, merjenih pri različnih omikah (Yugi idr., 2016). Obenem majhno število vzorcev, v primerjavi s številom dobljenih rezultatov, predstavlja možnost za večje število lažno pozitivnih rezultatov. Eden od možnih pristopov za rešitev omenjenih težav je integracija rezultatov, dobljenih na različnih molekularnih ravneh, in skupna analiza vseh rezultatov. S tem se izpostavijo predvsem spremembe, ki vplivajo na različne molekularne ravni, izgubijo pa se lažno pozitivni rezultati, ki so posledica tehničnih in statističnih metod (Maver, 2016).

Narejenih je bilo že več poskusov integracije različnih tipov omikskih podatkov. Prvi problem, ki ga takšni poskusi morajo premostiti, je neenotnost anotacij med različnimi tehnološkimi platformami,

ki merijo isto molekularno raven. Drugi problem pa se pojavi pri integriranju podatkov, pridobljenih na različnih molekularnih ravneh (npr. genom, transkriptom, proteom), saj se pristop za pridobitev teh podatkov znatno razlikuje. V večini preteklih poskusov integracije različnih omških podatkov je primerjava različnih molekularnih ravni potekala tako, da so se rezultati dodelili genom. Težava takega pristopa je, da izvzame gene brez anotacije in spremembe v področjih med geni. Tem težavam se lahko izognemo tako, da spremembe umestimo na celoten koordinatni sistem genoma, namesto da bi jih uvrstili le na posamezne gene – pristop pozicijske integracije. Glede na to, da lahko v pristopu pozicijske integracije uporabimo tudi podatke, ki niso vezani na gene, smo se odločili, da bomo za potrebe te naloge uporabili ta pristop (Maver, 2016; Maver & Peterlin, 2011).

Pri naši raziskavi smo za pozicijsko integracijo in analizo izbrali spletno orodje Integratomics (<http://genepark.mf.uni-lj.si/integratomics/home>). Integracija podatkov je pri tem spletnem orodju opravljena v dveh stopnjah. V prvi so združeni podatki raziskav iz istega molekularnega nivoja, v drugi pa so združeni rezultati prve integracije v končen rezultat (Maver, 2016; Maver & Peterlin, 2011).

Uporabljeno orodje integrira podatke preko uvrščanja določitev na referenčni genom. Za referenčni genom orodje uporablja genomski sestav UCSC, v različici hg19, iz februarja 2009. Slednji je ekvivalenten različici 37 genoma NCBI (Maver, 2016).

Referenčni genom orodje najprej razdeli v odseke z vnaprej določeno dolžino. Ti odseki imajo 50-odstotno prekrivanje, s čemer se orodje izogne akumulaciji signala na območju med odsekoma. Določitve iz podatkov se nato prevedejo na koordinate referenčnega genoma in vrednosti ( $-\log_{10}p$ -vrednosti), in se na podlagi koordinat dodelijo primernim odsekom. Vrednosti iz iste raziskave na istem odseku se seštejejo. Po določitvi vseh raziskav, orodje najprej integrira podatke različnih raziskav na istem molekularnem nivoju. V tem koraku uporabi orodje različne metode, odvisno od tipa molekularnega nivoja, ki ga je potrebno integrirati. Rezultate prvega koraka nato orodje uporabi kot vhodne podatke za drugi korak, v katerem združi različne nivoje v enoten rezultat. Za združevanje podatkov iz različnih molekularnih nivojev orodje uporablja pristop uvrstitvene statistike. To pomeni, da bodo višje na lestvici regije, ki vsebujejo v več raziskavah rezultate, statistično pomembne za zastavljeno vprašanje. Orodje najprej razvrsti regije glede na vsoto vrednosti signalov in jim dodeli zaporedno število glede na mesto v uvrstitvi (1 za najvišje uvrščeno regijo). Zatem orodje izračuna za vsako regijo vrednost produkta uvrstitev, ki ga nato statistično ovrednoti s simulacijami, kjer vrednosti regij naključno permutira glede na položaj v genomu. Permutacije nato primerja z originalnimi uvrstitvami. Rezultate orodje poda v obliki  $-\log_{10}p$ -vrednosti povezanosti posameznih regij z raziskovalnim vprašanjem (Maver, 2016; Maver & Peterlin, 2011).

### 3.3.1. Zbiranje podatkov

Reitz in Mayeux (2014) omenjata asociacijske študije polimorfizma posameznih nukleotidov celotnega genoma, opravljene v večjem obsegu (Reitz & Mayeux, 2014). Asociacijske študije polimorfizma posameznih nukleotidov so opravljene z uporabo mikromrež s hibridizacijskimi sondami. Te sonde so specifične za polimorfizme posameznih nukleotidov, ki so značilni za preiskovano populacijo (Amaro idr., 2016). Asociacijske študije se v analizi osredotočajo na bolj pogoste polimorfizme, zaradi česar je z njimi zelo težko odkriti visoko patogene polimorfizme v istem genu ali različnih genih.

Od osmih omenjenih raziskav, jih je šest opravljenih na kavkaški etnični skupini, zato so bili rezultati le-teh vključeni v metaanalizo. Nobena od vključenih raziskav ni objavila svojih podatkov na podatkovni bazi GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), zato smo rezultate v formatu tabele, z dostopnimi številkami in p-vrednostmi, pridobili iz dodatnega materiala objav. Vzeli smo le polimorfizme posameznih nukleotidov, ki so bili statistično pomembno povezani s PAB, pri čemer smo smatrali za statistično pomembne polimorfizme tiste, katerih p-vrednosti so znašale 0,05 ali manj. Raziskave so bile narejene v več fazah, pri čemer je bila zadnja vedno validacija izbranih statistično pomembnih polimorfizmov. Za namene metaanalize so bile vzete p-vrednosti zadnje faze pred validacijo. V primeru, da je imel polimorfizem p-vrednost 0,0, je bila vzeta p-vrednost iz predhodne faze. Tabela 4 vsebuje zbrane podatke o številu udeležencev v stopnjah študij, katerih rezultati so bili uporabljeni.

Tabela 4: Pregled asociacijskih študij celotnega genoma, katerih podatki so bili uporabljeni v metaanalizi.

Raziskava	Število udeležencev (AB bolnikov, kontrol)
(Harold idr., 2009)	11.789 (3.941, 7.848)
(Hollingworth idr., 2011)	20.373 (6.688, 13.685)
(Lambert idr., 2009)	7.275 (3.978, 3.297)
(Lambert idr., 2013)	74.046 (25.580, 48.466)
(Naj idr., 2011)	22.771 (11.840, 10.931)
(Seshadri idr., 2010)	25.008 (5.038, 19.970)

### 3.3.2. Procesiranje podatkov

Podatki so bili vneseni v tekstovno datoteko. Glava datoteke je obsegala tri vrstice:

1. tip raziskave,
2. ime raziskave in
3. tip merjenega signala.

Preostanek dokumenta je sestavljala, s tabulatorjem ločena, tabela dostopnih številk sprememb in podatek o statistični pomembnosti sprememb. Slika 2 prikazuje primer začetka tekstovne datoteke.

<b>GWAS</b>		} Tip raziskave
<b>Harold2009</b>		} Ime raziskave
<b>SNP</b>		} Tip merjenega signala
<b>rs2075650</b>	<b>1.80e-157</b>	} Tabela dostopnih številk in statistična pomembnost sprememb
<b>rs157580</b>	<b>9.60e-54</b>	
<b>rs6859</b>	<b>6.9e-41</b>	
<b>rs8106922</b>	<b>5.4e-39</b>	

Slika 2: Reprezentativni primer začetka tekstovne datoteke s podatki, uporabljenimi v metaanalizi.

### 3.3.3. Statistična analiza in preverjanje rezultatov

V analizi so bili odseki genoma dolgi 100.000 bp. Ob integraciji je bil uporabljen tudi permutacijski test s 1000 permutacijami. Glede na to, da so bili vsi vključeni podatki istega tipa, obtežitve tipov raziskav niso bile uporabljene. Ob končani analizi sta bila iz orodja izvožena tabela z rezultati in graf integratonskega rezultata v odvisnosti od pozicije na kromosomih.

## Materiali in metode

Gene iz regij z  $-\log_{10}p$ -vrednostjo nad 8 smo vključili v preverjanje na neodvisnih podatkih iz literature. Bazo Medline smo preiskali z iskalnim nizom »*Alzheimer's disease AND Gen*«, pri čemer je »*Gen*« predstavljala ime gena, ki nas je zanimal. V primeru, da rezultat iskanja ni vseboval za nas pomembne literature, smo bazo Medline preiskali z iskalnim nizom »*Gen*«. Funkcijo proteina, za katerega gen vsebuje zapis, smo preverili z iskanjem v bazi UniProt (The UniProt, 2017). Iskalni niz je vseboval kratico imena gena, ki nas je zanimal. Izbrali smo le zadetke, ki so del baze Swiss-Prot.



## 4. Rezultati

### 4.1. Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 113 bolnikov, obravnavanih v ambulantah Centra za kognitivne motnje na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, Nevrološke klinike. Od 21 možnih diagnoz smo za nadaljnjo statistično analizo izbrali BKM, kognitivni upad in SKP, saj so edine imele nad petnajst bolnikov (Tabela 5). To pomeni, da je bilo v nadaljnjo analizo vključenih 74 bolnikov.

Tabela 5: Razdelitev bolnikov glede na diagnozo.

<i>Diagnoza</i>	<i>Število oseb (delež vseh)</i>
<i>Blaga kognitivna motnja</i>	40
<i>Kognitivni upad</i>	18
<i>Subjektivna kognitivna pritožba</i>	16
<i>Demenca AB tipa</i>	11
<i>Demenca</i>	7
<i>Demenca mešanega tipa</i>	4
<i>Parkinsonizem</i>	2
<i>Fronto-temporalna demenca</i>	2
<i>Kortikalna demenca pretežno vaskularnega tipa</i>	1
<i>Brez diagnoze</i>	1
<i>Glavobol</i>	1
<i>Demenca fronto-subkortikalnega tipa</i>	1
<i>Blaga kognitivna motnja kortikalnega tipa</i>	1
<i>Verjetna AB</i>	1
<i>Demenca nevrodegenerativnega tipa</i>	1
<i>Disociativna motnja</i>	1
<i>Post-punkcijski glavobol</i>	1
<i>Kortikalna demenca</i>	1
<i>Organska razpoloženska motnja</i>	1
<i>Demenca z Lewyjemi telesci</i>	1
<i>Vaskularna demenca</i>	1

Tabela 6 prikazuje povprečne vrednosti za numerične podatke in število oseb za nominalne klinične in laboratorijske podatke pri treh diagnozah, uporabljenih v analizi.

## Rezultati

Tabela 6: Značilnosti treh uporabljenih diagnoz pri zbranih kliničnih in laboratorijskih podatkih (N=74).

<i>Klinični in laboratorijski podatki</i>	<i>SKP Povprečje ± SD</i>	<i>Kognitivni upad Povprečje ± SD</i>	<i>BKM Povprečje ± SD</i>
<i>Spol (Ž/M)</i>	12 (75 %)/4 (25 %)	10 (55,6 %)/8 (44,4 %)	21 (52,5 %)/19 (47,5 %)
<i>Starost</i>	65,75 ± 9,35	75,44 ± 7,98	72,05 ± 9,20
<i>ITM</i>	27,90 ± 4,04	30,82 ± 9,12	26,87 ± 2,72
<i>KPSS</i>	28,71 ± 1,98	23,29 ± 3,82	26,94 ± 2,51
<i>MoCA</i>	26,42 ± 1,56	18,08 ± 4,52	23,43 ± 3,34
<i>Atrofija hipokampusa (Da/Ne)</i>	1 (12,5 %)/7 (87,5 %)	2 (20 %)/8 (80 %)	4 (25 %)/12 (75 %)
<i>Atrofija korteksa (Da/Ne)</i>	2 (18,2 %)/9 (81,8 %)	5 (50 %)/5 (50 %)	10 (55,6 %)/8 (44,4 %)
<i>Atrofija beline (Da/Ne)</i>	2 (18,2 %)/9 (81,8 %)	3 (30 %)/7 (70 %)	5 (27,8 %)/13 (72,2 %)
<i>CST glukoza</i>	3,41 ± 0,40	3,19 ± 0,34	3,65 ± 0,72
<i>CST proteini</i>	0,45 ± 0,14	0,65 ± 0,25	0,56 ± 0,57
<i>CST laktat</i>	2,58 ± 3,45	3,78 ± 5,25	1,75 ± 0,31
<i>CST levkociti</i>	1,46 ± 0,66	2,2 ± 2,78	2,17 ± 1,44
<i>CST limfociti</i>	1,23 ± 0,44	1,67 ± 2,06	1,81 ± 1,00
<i>CST eritrociti</i>	210,17 ± 471,81	153,27 ± 254,36	249,57 ± 818,77
<i>CST tau</i>	285,08 ± 160,18	425,73 ± 209,58	403,00 ± 279,19
<i>CST p-tau</i>	50,08 ± 23,87	61,47 ± 25,65	66,37 ± 37,07
<i>CST Aβ</i>	1168,54 ± 227,90	796,60 ± 278,78	1130,54 ± 418,56
<i>Arterijska hipertenzija (Da/Ne)</i>	4 (26,7 %)/11(73,3 %)	5 (27,8 %)/13(72,2 %)	15 (38,5 %)/24 (61,5 %)
<i>Diabetes (Da/Ne)</i>	2 (13,3 %)/13 (86,7 %)	2 (11,1 %)/16 (88,9 %)	10 (25,6 %)/29 (74,4 %)
<i>Vaskularna levkopatija (Da/Ne)</i>	3 (20 %)/12 (80 %)	2 (11,1 %)/16 (88,9 %)	7 (17,9 %)/32 (82,1 %)
<i>Razpoloženska motnja (Da/Ne)</i>	2 (13,3 %)/13 (86,7 %)	0 (0 %)/18 (100 %)	4 (10,3 %)/35 (89,7 %)
<i>Anksiozno-depresivna motnja (Da/Ne)</i>	3 (20 %)/12 (80 %)	3 (16,7 %)/15 (83,3 %)	10 (25,6 %)/29 (74,4 %)
<i>Sindrom fibromialgije (Da/Ne)</i>	0 (0 %)/15 (100 %)	0(0 %)/18 (100 %)	3 (7,7 %)/36 (92,3 %)
<i>Hiperlipidemija (Da/Ne)</i>	2 (13,3 %)/13 (86,7 %)	3 (16,7 %)/15 (83,3 %)	4 (10,3 %)/35 (89,7 %)

SKP: Subjektivna kognitivna pritožba; BKM: Blaga kognitivna motnja.

## 4.2. Analiza genotipa Apolipoproteina E

Izolirani DNA je bila določena koncentracija in razmerji absorbance pri treh valovnih dolžinah. Povprečna koncentracija DNA je bila 183,33 ng/ $\mu$ L, povprečno razmerje  $A_{260}/A_{230}$  je znašalo 1,59, povprečno razmerje  $A_{260}/A_{280}$  pa 1,79 (Tabela 7).

Tabela 7: Rezultati analize čistosti DNA.

Diagnoza	Koncentracija [ng/ $\mu$ L]	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$
	Povprečje $\pm$ SD	Povprečje $\pm$ SD	Povprečje $\pm$ SD
Blaga kognitivna motnja	171,79 $\pm$ 112,89	1,50 $\pm$ 0,59	1,72 $\pm$ 0,19
Kognitivni upad	181,66 $\pm$ 81,76	1,73 $\pm$ 0,46	1,76 $\pm$ 0,07
Subjektivna kognitivna pritožba	187,17 $\pm$ 89,28	1,58 $\pm$ 0,63	1,74 $\pm$ 0,21
Vzorci, vključeni v statistično analizo	177,46 $\pm$ 100,46	1,57 $\pm$ 0,57	1,73 $\pm$ 0,17
Vsi vzorci	183,33 $\pm$ 111,45	1,59 $\pm$ 0,56	1,79 $\pm$ 0,35

Izolirana DNA je bila uporabljena za določitev genotipa ApoE. Iz talilnih temperatur je bil določen genotip vsakega vzorca. Tabela 8 vsebuje število vzorcev s posameznim genotipom znotraj vsake od treh diagnoz, uporabljenih v analizi, in frekvenco genotipa znotraj diagnoze. Iz teh podatkov so bile preračunane tudi frekvence posameznih alelov znotraj treh populacij bolnikov (Tabela 9).

Tabela 8: Število in frekvenca posameznih genotipov znotraj analiziranih diagnoz.

Genotip	SKP	Kognitivni upad	BKM	Skupno	Celotna populacija
	Število (frekvenca)	Število (frekvenca)	Število (frekvenca)	Število (frekvenca)	Število (frekvenca)
E2/E2	1 (0,07)	2 (0,11)	0 (0,00)	2 (0,028)	3 (0,042)
E2/E3	0 (0,00)	2 (0,11)	2 (0,05)	4 (0,056)	4 (0,056)
E2/E4	0 (0,00)	1 (0,06)	0 (0,00)	1 (0,014)	1 (0,014)
E3/E3	9 (0,60)	7 (0,39)	25 (0,64)	41 (0,58)	41 (0,57)
E3/E4	5 (0,33)	3 (0,17)	10 (0,26)	18 (0,25)	18 (0,25)
E4/E4	0 (0,00)	3 (0,17)	2 (0,05)	5 (0,070)	5 (0,0070)

SKP: Subjektivna kognitivna pritožba; BKM: Blaga kognitivna motnja; skupno: združeni vzorci SKP, kognitivni upad in BKM; celotna populacija: celotna genotipizirana populacija.

Tabela 9: Frekvence posameznih alelov znotraj analiziranih diagnoz.

Alel	SKP	Kognitivni upad	BKM	Skupno
	Frekvenca	Frekvenca	Frekvenca	Frekvenca
E2	0,067	0,19	0,026	0,063
E3	0,77	0,53	0,79	0,733
E4	0,17	0,28	0,18	0,202

SKP: Subjektivna kognitivna pritožba; BKM: Blaga kognitivna motnja.

Izračunana je bila občutljivost in specifičnost genotipa ApoE E4/E4 in prisotnosti vsaj enega alela E4 za vse tri diagnoze, vključene v analizo (Tabela 10).

## Rezultati

*Tabela 10: Občutljivost in specifičnost genotipov ApoE E4/E4 in ApoE E4/- za tri analizirane diagnoze.*

Skupina	E4/E4		E4/-	
	Občutljivost	Specifičnost	Občutljivost	Specifičnost
SKP	0	0,69	0,21	0,67
KU	0,6	0,69	0,29	0,78
BKM	0,4	0,25	0,5	0,45

SKP: Subjektivna kognitivna pritožba; KU: kognitivni upad; BKM: Blaga kognitivna motnja; E4/- se nanaša na genotipe E4/E4, E4/E3 in E4/E2.

V bazi ExAC smo poiskali polimorfizma genotipov ApoE E4 in ApoE E2 in vzeli število homozigotov in heterozigotov manjšega alela ter število oseb brez manjšega alela v evropski populaciji, brez Finske (Tabela 11). Podatki iz baze ExAC so se statistično pomembno razlikovali od celotne genotipizirane populacije, tako v primeru primerjave genotipov z ApoE E4 (p-vrednost 0,019), kot tudi v primeru primerjave genotipov z ApoE E2 (p-vrednost 0,0002).

*Tabela 11: Podatki iz baze ExAC za genotipa ApoE E4 in ApoE E2*

Določitevno število polimorfizma in ime manjšega alela	rs429358 (ApoE E4) število (frekvenca)	rs7412 (ApoE E2) število (frekvenca)
Število homozigotov	<b>161</b> (0,022)	<b>17</b> (0,0072)
Število heterozigotov	<b>2717</b> (0,37)	<b>464</b> (0,197)
Število ostalih	<b>4435</b> (0,61)	<b>1869</b> (0,795)

Pri primerjavi med BKM in SKP je bila statistično pomembna razlika ugotovljena v primeru hiperlipidemije (p-vrednost 0,03), ki pa ni dosegala statistično pomembne razlike pri primerjavi kognitivnega upada s SKP (p-vrednost 0,06) in BKM (p-vrednost 0,05).

Razpoloženska motnja se je statistično pomembno razlikovala pri vseh treh primerjavah. Sindrom fibromialgije je dosegel statistično pomembno vrednost pri primerjavi BKM s kognitivnim upadom (p-vrednost 0,0007) in SKP (p-vrednost 0,0007). Primerjava pojava sindroma fibromialgije med vzorcem kognitivnega upada in vzorcem SKP ni bila mogoča, saj v obeh populacijah ni bilo bolnika, pozitivnega na sindrom fibromialgije.

Sladkorna bolezen se je statistično pomembno razlikovala pri primerjavi kognitivnega upada in SKP (p-vrednost 0,04). Ostali Hi-kvadrat testi niso pokazali statistično pomembnih rezultatov.

Porazdelitve frekvenc genotipov se niso statistično pomembno razlikovale pri primerjavi vseh treh diagnoz (p-vrednost 0,99)

Za numerične spremenljivke je bila normalnost porazdelitve preverjena s Shapirovim testom (Tabela 12). Vsi podatki, z izjemo starosti in ravniyo glukoze v CST in ITM, so imeli statistično pomembni rezultat testa, kar je pomenilo, da so bile vrednosti porazdeljene nenormalno.

Tabela 12: Rezultati Shapirovega testa za numerične spremenljivke.

		<b>BKM</b>	<b>KU</b>	<b>SKP</b>
<b>Starost</b>	Rezultat	0,97	0,96	0,98
	p-vrednost	0,31	0,53	0,91
<b>KPSS</b>	Rezultat	0,86	0,85	0,68
	p-vrednost	0,00081	0,010	0,00022
<b>Ab</b>	Rezultat	0,92	0,90	0,86
	p-vrednost	0,012	0,10	0,035
<b>Glukoza</b>	Rezultat	0,95	0,92	0,89
	p-vrednost	0,097	0,23	0,095
<b>Laktat</b>	Rezultat	0,91	0,47	0,39
	p-vrednost	0,0098	0,000002	0,000002
<b>Tau</b>	Rezultat	0,79	0,93	0,91
	p-vrednost	0,000014	0,29	0,20
<b>P-Tau</b>	Rezultat	0,85	0,94	0,91
	p-vrednost	0,00030	0,43	0,18
<b>Levkociti</b>	Rezultat	0,84	0,46	0,71
	p-vrednost	0,00015	0,000002	0,00069
<b>Eritrociti</b>	Rezultat	0,33	0,65	0,52
	p-vrednost	$1,7 \times 10^{-11}$	0,000080	0,000026
<b>Proteini</b>	Rezultat	0,40	0,96	0,94
	p-vrednost	$8,1 \times 10^{-11}$	0,76	0,40
<b>Itm</b>	Rezultat	0,91	0,90	0,94
	p-vrednost	0,33	0,38	0,59
<b>Limfociti</b>	Rezultat	0,77	0,37	0,53
	p-vrednost	0,000012	$3,9 \times 10^{-7}$	0,000018
<b>MoCA</b>	Rezultat	0,80	0,94	0,95
	p-vrednost	0,00009	0,45	0,62

BKM: Blaga kognitivna motnja; KU: Kognitivni upad; SKP: Subjektivna kognitivna pritožba.

Normalno porazdeljeni podatki – starost, raven glukoze v CST in ITM, so bili analizirani s pomočjo t-testa (Tabela 13). Statistično pomembni rezultati so bili dobljeni pri starosti, pri primerjavi SKP z BKM (p-vrednost 0,03) in kognitivnim upadom (p-vrednost 0,003). Koncentracija glukoze v CST se je statistično pomembno razlikovala med BKM in kognitivnim upadom (p-vrednost 0,02).

## Rezultati

Tabela 13: Rezultati t-testa.

		<b>BKM:KU</b>	<b>BKM:SKP</b>	<b>KU:SKP</b>
<b>Starost</b>	Rezultat	-1,35	2,30	3,26
	p-vrednost	0,18	0,025	0,0026
<b>Glukoza</b>	Rezultat	2,37	1,15	-1,59
	p-vrednost	0,022	0,26	0,12
<b>Itm</b>	Rezultat	-1,19	-0,60	0,77
	p-vrednost	0,27	0,56	0,46

BKM: Blaga kognitivna motnja; KU: Kognitivni upad; SKP: Subjektivna kognitivna pritožba.

Za analizo numeričnih podatkov, ki nimajo normalne porazdelitve, je bil uporabljen Mann Whitneyev U test (Tabela 14). KPSS in MoCA sta se statistično pomembno razlikovala med vsemi tremi diagnozami. Koncentracija A $\beta$  v CST se je statistično pomembno razlikovala med kognitivnim upadom in BKM (p-vrednost 0,01) ter med kognitivnim upadom in SKP (p-vrednost 0,0004). Enako je veljalo tudi za koncentracijo proteinov v CST (p-vrednosti 0,03 in 0,02 v enakem vrstnem redu), medtem ko je koncentracija laktata v CST dosegla statistično pomembno razliko samo pri primerjavi kognitivnega upada in SKP (p-vrednost 0,05).

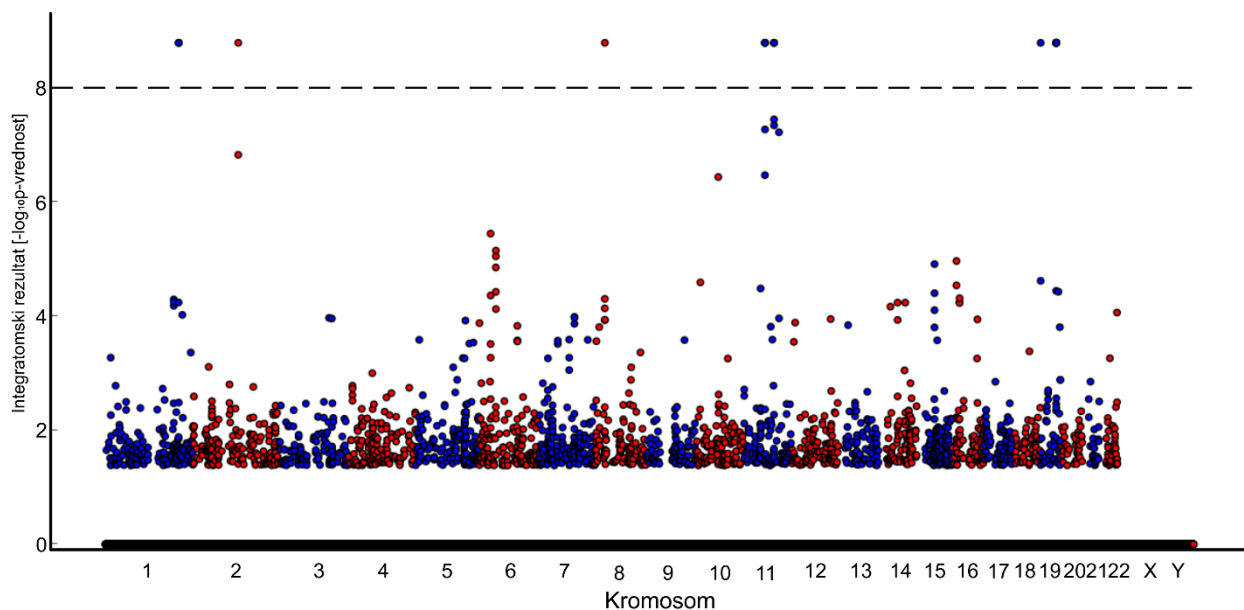
Tabela 14: Rezultati Mann-Whitneyevega U testa.

		<b>BKM:KU</b>	<b>BKM:SKP</b>	<b>KU:SKP</b>
<b>KPSS</b>	Rezultat	437	97,5	15,5
	p-vrednost	0,00017	0,0030	0,000037
<b>Ab</b>	Rezultat	382	225,5	20
	p-vrednost	0,012	0,97	0,00039
<b>Laktat</b>	Rezultat	177,5	271	140,5
	p-vrednost	0,071	0,32	0,049
<b>Tau</b>	Rezultat	219	293,5	134
	p-vrednost	0,36	0,13	0,097
<b>P-Tau</b>	Rezultat	283	278,5	119,5
	p-vrednost	0,67	0,24	0,32
<b>Levkociti</b>	Rezultat	299	283,5	107,5
	p-vrednost	0,42	0,17	0,62
<b>Eritrociti</b>	Rezultat	207	189	99
	p-vrednost	0,22	0,60	0,67
<b>Proteini</b>	Rezultat	162	267	149
	p-vrednost	0,034	0,37	0,019
<b>Limfociti</b>	Rezultat	312	276	96
	p-vrednost	0,064	0,057	0,95
<b>MoCA</b>	Rezultat	294	56	1
	p-vrednost	0,00019	0,00086	0,000045

BKM: Blaga kognitivna motnja; KU: Kognitivni upad; SKP: Subjektivna kognitivna pritožba.

### 4.3. Integratomika

V integratomski analizi ima 13 odsekov  $-\log_{10}p$ -vrednost višjo od 8. Na teh odsekih se skupno nahaja devetnajst genov. Devet odsekov se nahaja na kromosomu 19, od katerih po tri in pet odsekov leži v neposredni bližini (se prekriva ali stika med seboj). Dva odseka se nahajata na kromosomu 1, preostala dva odseka pa se nahajata na kromosomih 8 in 11 (Tabela 15). Po združitvi sosednjih odsekov nam je ostalo sedem odsekov različnih dolžin. Slika 3 prikazuje graf integratomskega rezultata v odvisnosti od kromosomske pozicije. Graf je ustvarjen avtomatsko v uporabljenem orodju.



Slika 3: Graf integratomskega rezultata v odvisnosti od kromosomske pozicije. Vsaka pika na grafu predstavlja odsek, vključen v analizo. Integratomski rezultat je podan kot  $-\log_{10}p$ -vrednosti.

Tabela 15: Odseki z najvišjim rezultatom v integratovski analizi.

<i>Koordinate</i>	<i>Gen, prisotnen na odseku (HGNC simbol gena)</i>	<i>Ensembl številka</i>	<i>Rezultat -log<sub>10</sub>p</i>
<i>chr1-207650000-207749999</i>	<i>Receptor komplementa C3d (CR2)</i>	ENSG00000117322	8,79
<i>chr1-207800000-207899999</i>	<i>Pseudogen membranskega kofaktorskega proteina (CD46P1)*</i>	ENSG00000244703	8,79
<i>chr8-27450000-27549999</i>	<i>Klusterin (CLU)*</i>	ENSG00000120885	8,79
<i>chr11-59850000-59949999</i>	<i>Beta podenota visoko afinitetnega imunoglobulinskega epsilon receptorja (MS4A2)*</i>	ENSG00000149534	8,79
<i>chr19-1000000-1099999</i>	<i>Odpri bralni okvir 6 na kromosomu 19 (C19orf6)</i>	ENSG00000182087	8,79
	<i>Kalponin 2 (CNN2)*</i>	ENSG00000064666	8,79
	<i>3b podenota ionotropičnega glutamatnega receptorja, NMDA (GRIN3B)</i>	ENSG00000116032	8,79
<i>chr19-45200000-45299999</i>	<i>S karcinoembrionskim antigenom povezana celična adhezijska molekula 16 (CEACAM16)</i>	ENSG00000186567	8,79
<i>chr19-45250000-45349999</i>	<i>B-celični limfomski protein 3 (BCL3)</i>	ENSG00000069399	8,79
<i>chr19-45300000-45399999</i>	<i>Bazalna celična adhezijska molekula (BCAM)</i>	ENSG00000187244	8,79
<i>chr19-45400000-45499999</i>	<i>Apolipoprotein C-1 (APOC1)*</i>	ENSG00000130208	8,79
	<i>Pseudogen apolipoproteina C-1 (APOC1P1)</i>	ENSG00000214855	8,79
	<i>Apolipoprotein E (APOE)*</i>	ENSG00000130203	8,79
<i>chr19-45450000-45549999</i>	<i>Transmembranski protein režne ustnice in neba (CLPTM1)</i>	ENSG00000104853	8,79
<i>chr19-45600000-45699999</i>	<i>Pseudogen evkariontskega iniciacijskega dejavnika 5a (EIF5AP3)</i>	ENSG00000267346	8,79
<i>chr19-45650000-45749999</i>	<i>Podenota 3 kompleksa 1 z biogenezo lizosomov povezanih organelov (BLOC1S3)</i>	ENSG00000189114	8,79
	<i>NTPazna KAP družina P-zanke domeno vsebujoči protein 1 (NKPD1)</i>	ENSG00000179846	8,79
	<i>Podenota 6a kompleksa razvrščanja proteinskih delcev (TRAPPC6A)</i>	ENSG00000007255	8,79
<i>chr19-45700000-45799999</i>	<i>Komponenti 3 eksocistnega kompleksa podoben protein 2 (EXOC3L2)*</i>	ENSG00000283632	8,79

Koordinate so definirane glede na referenčni genomski sestav UCSC v različici hg19, iz februarja 2009.

\* Povezava gena z AB je bila potrjena v neodvisnih študijah.



## 5. Razprava

V ambulantah Centra za kognitivne motnje na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, Nevrološke klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, je bilo v raziskavo povabljenih 113 bolnikov. Od teh je bilo v končno analizo vključenih le 74 oseb, ki so spadale v tri najbolj pogoste diagnoze (subjektivna kognitivna pritožba, blaga kognitivna motnja in kognitivni upad). V raziskavi so bili uporabljeni klinični podatki bolnikov, poleg tega pa jim je bila odvzeta kri, iz katere je bila izolirana DNA. Koncentracija DNA se je med vzorci zelo razlikovala, vendar je kljub temu določitev genotipa ApoE pri vseh, s pomočjo qPCR, uspela. Najpogostejši genotip je bil ApoE E3/E3, kar je skladno z literaturo (Ward idr., 2012). Pri statistični analizi podatkov je bila statistično pomembna razlika pri primerjavi BKM in SKP v primeru prisotnosti hiperlipidemije, razpoloženske motnje in sindroma fibromialgije, poleg tega pa tudi pri starosti in rezultatih testov KPSS ter MoCA. Pri primerjavi BKM in kognitivnega upada so se s statistično pomembnostjo razlikovali: prisotnost razpoloženske motnje in sindroma fibromialgije, raven glukoze, A $\beta$  in proteinov v CST ter rezultati testov KPSS in MoCA. SKP in kognitivni upad sta se statistično pomembno razlikovala v enakih podatkih, z izjemo prisotnosti sindroma fibromialgije, pri kateri razlika ni bila statistično pomembna, in prisotnosti sladkorne bolezni, pri kateri razlika ni bila statistično pomembna pri primerjavi BKM in kognitivnega upada.

Ward idr. (2012) so opravili metaanalizo razširjenosti ApoE E4 alela pri bolnikih z verjetno AB iz publikacij v angleškem jeziku, iz obdobja med leti 1985 in 2010. Njihovim kriterijem je zadostovalo 139 raziskav, iz katerih so v metaanalizo vključili 27.109 oseb. Najvišja razširjenost alela ApoE E4 in genotipa ApoE E4/E4 je bila v severni Evropi, medtem ko je bila najnižja v južni Evropi in Aziji (Tabela 16). Ward idr. (2012) so v metaanalizo vključili 21 raziskav izvedenih v državah, ki mejijo na Slovenijo. Od teh jih je bilo osemnajst opravljenih v Italiji, dve na Madžarskem in ena v Avstriji (Ward idr., 2012). Frekvenca alela ApoE E4 v celotni genotipizirani populaciji je za 0,7 % višja od pojavnosti tega alela v Avstriji, v primerjavi z ostalimi področji pa je nižja. Od frekvenc alela ApoE E4, znotraj posameznih skupin, je tudi frekvenca pri skupini pacientov s kognitivnim upadom višja od pojavnosti alela ApoE E4 v Avstriji in nižja od pojavnosti v ostalih področjih. Frekvence alela ApoE E4 znotraj ostalih dveh skupin so nižje od vseh pojavnosti tega alela, opisanih v Ward idr. (2012). Od frekvenc genotipa ApoE E4/E4 je od vseh pojavnosti genotipa v Ward idr. (2012) višja le pri pacientih s kognitivnim upadom. Pri ostalih skupinah in pri celotni genotipizirani populaciji je ta frekvenca nižja od pojavnosti v literaturi. Ob primerjavi rezultatov genotipizacije s skupinami v Ward idr. (2012) s pomočjo Hi-kvadrat testa se je od tujih vzorcev statistično pomembno razlikovala le skupina z BKM (p-vrednosti ob primerjavi s Severno Evropo, Južno Evropo, Azijo in Italijo 0,036, 0,0047, 0,026 in 0,0085 v zaporedju), vendar ne ob primerjavi z Madžarskim vzorcem (p-vrednost 0,074). Pri BKM obstaja možnost, da bi bili rezultati analize drugačni, saj znotraj te skupine presenetljivo ni bilo nobenega genotipa ApoE E4/E4. Tako frekvence genotipov ApoE, kot tudi posameznih alelov, se med skupinami niso statistično pomembno razlikovale.

Tabela 16: Razširjenost alela ApoE E4 in genotipa ApoE E4/E4 pri različnih populacijah.

		Razširjenost alela ApoE E4 [%]	Razširjenost genotipa ApoE E4/E4 [%]
<i>Ward idr. (2012)</i>	Severna Evropa	61,25	14,10
	Južna Evropa	40,45	4,56
	Azija	41,88	7,70
	Italija	39,08	5,07
	Madžarska*	63,3 in 43,8	20,0 in 7,8
	Avstrija	26,0	/
<i>Rezultati genotipizacije</i>	Celoten vzorec	26,7	7,0
	SKP	17	5,0
	KU	28	17
	BKM	18	0,00

SKP: subjektivna kognitivna motnja; KU: kognitivni upad; BKM: blaga kognitivna motnja.

\* Za Madžarsko sta podana rezultata obeh raziskav, opravljenih na tem področju.

Za vse tri skupine, vključene v analizo, je bila izračunana občutljivost in specifičnost genotipa ApoE E4/E4 in prisotnosti alela ApoE E4. Občutljivost genotipa ApoE E4/E4 pri SKP je bila 0, predvsem zaradi majhnega nabora udeležencev s to diagnozo. Najvišjo občutljivost in specifičnost je dosegel genotip ApoE E4/E4 pri skupini s KU (0,6 in 0,69 v zaporedju). Prisotnost alela ApoE E4 je dosegla najvišjo občutljivost pri skupini z BKM (0,5), najvišjo specifičnost pa pri skupini s KU (0,78).

Število posameznih genotipov pri celotni genotipizirani populaciji je bilo primerjano s podatki za Evropsko populacijo, izvzemajoč Finsko, iz baze ExAC. Podatki, uporabljeni v primerjavi, so bili: število homozigotov in heterozigotov manjšega alela za polimorfizma, ki tvorita alela ApoE E2 in ApoE E4. Zaradi različnih mest znotraj zaporedja gena, kjer se polimorfizma nahajata, je bila primerjava opravljena za vsak polimorfizem posebej. Obe primerjavi sta bili statistično pomembni, kar pomeni, da so porazdelitve genotipov v populaciji, vključeni v to raziskavo, razlikujejo od porazdelitve genotipov v splošni evropski populaciji, izvzemajoč Finsko.

Arterijska hipertenzija je povezana s kognitivnim upadom, vendar le v primeru, ko oseba ne prejema zdravljenja za vaskularna obolenja (Campbell idr., 2013). Poleg tega ima hipertenzija negativen učinek na pojav verjetne AB le v srednjem življenjskem obdobju, medtem ko v poznem življenjskem obdobju deluje zaščitno (Reitz & Mayeux, 2014). V populaciji, vključeni v to raziskavo, se skupine niso statistično pomembno razlikovale v pojavnosti arterijske hipertenzije. Glede na to, da so bili podatki o pridruženih motnjah vzeti tudi iz podatkov o zdravljenih, ki jih bolniki prejema, je eden od možnih vzrokov za odsotnost razlike med skupinami v odsotnosti efekta, zaradi zdravljenja hipertenzije. Obenem pa se lahko negativni in pozitivni vplivi hipertenzije znotraj vključenih vzorcev izničijo.

Raziskave dejavnikov, ki vplivajo na razvoj verjetne AB iz BKM, so z razvojem bolezni statistično pomembno povezale tudi sladkorno bolezen (Campbell idr., 2013), katere pojavnost pa je v našem primeru statistično pomembno različna le med kognitivnim upadom in SKP. Čeprav prisotnost sladkorne bolezni tipa 2 poveča možnost za razvoj verjetne AB kar za faktor 2, točni mehanizmi, ki povezujejo sladkorno bolezen z AB, še niso znani. Med drugim sta sladkorna bolezen in verjetna AB povezana tudi preko drugih dejavnikov, kot je na primer hipertenzija (Reitz & Mayeux, 2014). Fibromialgija je revmatološko stanje, ki se odraža kot kronična bolečina s povečano utrujenostjo, stresom in težavami s spanjem. V Evropi je približno 5 % ljudi diagnosticiranih z njo. Po

priporočilih naj bi bile spremembe v kogniciji upoštevane med diagnosticiranjem bolnika (Heymann idr., 2017; Tzeng idr., 2018). Bolniki s fibromialgijo v testih delovnega in dolgoročnega spomina dosegajo enake rezultate, kot 20 let starejše zdrave osebe (Park, Glass, Minear, & Crofford, 2001). Obenem prisotnost fibromialgije poveča tveganje za razvoj demence za kar 2,77-krat (Tzeng idr., 2018). V vzorcu, vključenem v našo raziskavo, se je prisotnost fibromialgije statistično pomembno razlikovala pri vseh treh skupinah. Obenem je frekvenca prisotnosti fibromialgije v našem vzorcu s SKP in kognitivnim upadom enaka 100 %, medtem ko je pri BKM 92,3 %. Če upoštevamo še majhno število bolnikov, vključenih v raziskavo, s trenutnimi podatki ne moremo zaključiti, da je prisotnost sindroma fibromialgije statistično pomembno povezana z razlikovanjem med tremi diagnozami, uporabljenimi v raziskavi.

Koncentracija A $\beta$  v CST se je statistično pomembno razlikovala pri diagnozi kognitivnega upada, v primerjavi z drugima dvema diagnozama. Pri BKM in verjetni AB pričakujemo povišano raven A $\beta$  v CST, medtem ko je običajno raven vseh merjenih oblik proteina tau znižana (Reitz & Mayeux, 2014). Zanimivo je, da se v našem primeru BKM in SKP nista razlikovali v nobenem od omenjenih laboratorijskih testov.

KPSS je bil razvit leta 1975, kot test za psihiatrične bolnike. Do tedaj uporabljeni testi kognitivne zmogljivosti so bili dolgi, kar za testiranje določenih bolnikov ni bilo ugodno (Folstein, Folstein, & McHugh, 1975). Zaradi slabe moči testa pri diagnosticiranju BKM, je bil kasneje razvit test MoCA, ki je lahko bolje razlikoval med kognitivno normalnimi osebami in osebami z BKM, ki še vedno dosegajo normalen rezultat pri testiranju s KPSS (Nasreddine idr., 2005). Znotraj našega vzorca sta oba testa s statistično pomembnostjo razlikovala med vsemi tremi diagnozami, kar glede na namen obeh testov ni bilo presenetljivo.

Starost je pogost dejavnik za prehod med različnimi stopnjami demence (Campbell idr., 2013), zato ni bilo presenetljivo, da se je starost statistično pomembno razlikovala med SKP in ostalima dvema skupinama.

Dejavniki, pomembni za razvoj AB, so med drugim tudi kajenje, uživanje alkohola, pomanjkanje fizične in intelektualne aktivnosti ter nizka dosežena stopnja izobrazbe (Barnes & Yaffe, 2011; Reitz & Mayeux, 2014). Pri vseh slednjih dejavnikih je bilo znotraj vzorca, uporabljenega v raziskavi, premalo podatkov, da bi bili lahko uporabljeni v analizi, zato so bili iz le-te izločeni. Predvsem dosežena stopnja izobrazbe lahko znatno vpliva na druge podatke. Na primer, pri osebah z doseženo višjo stopnjo izobrazbe, pritožbe o zmanjšanju kognitivne zmogljivosti, s pomočjo katerih je postavljena diagnoza SKP, vodijo bolj zanesljivo v izmerljivo zmanjšanje zmogljivosti kasneje, napram enakim pritožbam pri osebah z nižjo doseženo stopnjo izobrazbe (Garcia-Ptacek idr., 2016).

V integratormski analizi so bili vključeni rezultati šestih asociacijskih študij polimorfizmov posameznih nukleotidov celotnega genoma. V področjih z najvišjim rezultatom analize se nahaja devetnajst genov (Tabela 15). Humphries idr. (2015) so v svojo analizo izražanja vključili sedem od teh genov (*CNN2*, *GRIN3B*, *C19orf6*, *CLU*, *CD46P1*, *CR2* in *MS4A2*), od katerih so statistično pomembno razliko v izražanju opazili le pri *CNN2* in *CD46P1*. Pri primerjavi med bolniki z AB in bolniki z demenco, z Lewijemi telesci, pa je statistično pomembno razliko dosegal le *CNN2*. *CR2* in *MS4A2* nista mogla biti primerjana zaradi prenizke ravni izražanja (Humphries idr., 2015). Receptor komplementa C3d (*CR2*) je gen z zapisom za transmembranski protein, udeležen v imunskem odzivu. Izraža se v velikem naboru celic, med drugim tudi v astrocitih. Pomanjkanje izražanja *CR2* vodi v imunsko pomanjkljivost (Boackle, 2018). *CR2* se na genomu nahaja v neposredni bližini receptorja komplementa 1 (*CRI*) (Pimenova idr., 2018), ki je pogosto statistično pomembno povezan z AB v asociacijskih študijah (Karch idr., 2014; Pimenova idr., 2018). *CRI* je, kot *CR2*, večinoma izražen v celicah imunskega sistema in udeležen v imunski odziv. V

osrednjem živčnem sistemu je primarno izražen v celicah mikroglije. Izražanje gena *CRI* je pri bolnikih z AB spremenjeno. Čeprav je bilo že več mutacij gena *CRI* povezanih z AB, mehanizem vpliva *CRI* še ni znan (Humphries idr., 2015; Pimenova idr., 2018; Shao idr., 2017). V bližini *CRI* se nahaja tudi psevdogen gena *CD46* (*CD46PI*). Do sedaj še ni znana nobena funkcija, pri kateri bi ta gen deloval, opaženi pa so bili samo kratki prepisi gena v zelo majhnih količinah (Ly, Tang, & Roca, 2017)

Gen *CLU* je pogosto statistično pomembno povezan z AB, v asociacijskih študijah celotnega genoma. Udeležen je v imunski odziv in metabolizem lipidov. Vsebuje zapis za clusterin, ki se v osrednjem živčnem sistemu izraža predvsem v astrocitih. Poleg tega, da se je clusterin zmožen vezati na A $\beta$ , je njegova koncentracija v osrednjem živčnem sistemu in CST, pri bolnikih z AB, povečana. Obenem so raziskave v posmrtnem tkivu odkrile spremenjeno izražanje gena *CLU* pri obolelih (Karch idr., 2014; Pimenova idr., 2018; Shao idr., 2017; Verheijen & Sleegers, 2018).

Gruča genov *MS4A* je tudi udeležena v imunski odziv in se pogosto znajde med rezultati asociacijskih študij celotnega genoma. V osrednjem živčnem sistemu se ta gruča izraža primarno v celicah mikroglije. Gen *MS4A2* je udeležen tako v imunosti, kot tudi v regulaciji kalcija v celici. Najpogosteje so znotraj te gruče genov z AB povezani: *MS4A4A*, *MS4A4E* in *MS4A6A*. Spremenjena raven izražanja *MS4A4A* in *MS4A6A* je bila povezana z AB (Karch idr., 2014; Pimenova idr., 2018; Shao idr., 2017).

Sicer v metaanalizi znotraj skupin genov z najvišjim rezultatom nismo dobili gena *ABCA7*, ki je pogosto prisoten v rezultatih asociacijskih študij celotnega genoma, smo pa dobili gen, ki se nahaja v njegovi neposredni bližini – *CNN2* (Pimenova idr., 2018). V isti regiji se nahajata tudi gena *C19orf6* in *GRIN3B*. *CNN2* vsebuje zapis za kalponin 2. Kalponin 2 se nahaja v različnih vrstah tkiva, kjer predvsem stabilizira aktinski citoskelet (Liu & Jin, 2016). Izražanje kalponina 2 je pri bolnikih z AB spremenjeno (Humphries idr., 2015). Gen *GRIN3B* vsebuje zapis za eno od podenot N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptorjev. Spremembe v NMDA receptorjih so povezane s psihiatričnimi motnjami, kot je na primer shizofrenija, mutacije v genu *GRIN3B* pa so prisotne tudi pri osebah z avtizmom (Burnashev & Szepetowski, 2015). Gen *C19orf6* vsebuje zapis za protein membralin, ki je bil prvič opažen v celični liniji raka na jajčnikih. Membralin je pri podganah izražen tudi v osrednjem živčnem sistemu, vendar njegove točne vloge ne poznamo. Je edini predstavnik svoje proteinske družine in je zelo ohranjen med vrstami (Chen idr., 2005).

*CEACAM16* je gen iz družine s karcinoembrionskim antigenom povezanimih adhezijskih molekul (CEACAM). Proteini iz družine CEACAM opravljajo svoje funkcije v medcelični prepoznavi (Kuespert, Pils, & Hauck, 2006).

*BCL3* je gen, prvič najden pri bolnikih z levkemijo. Vsebuje zapis za protein B-celične kronične limfatične levkemije 3, ki se večinoma nahaja v jedru. Tam je udeležen v regulacijo transkripcije. Ob spremenjenem izražanju vpliva na proliferacijo in celično preživetje. Ob supresiji *BCL3* se poveča izražanje citokinov, ki spodbujajo vnetje (Chang & Vancurova, 2014).

Bazalna celična adhezijska molekula (*BCAM*) je gen z zapisom za protein, ki je del transmembranskega glikoproteina Lu/BCAM. Slednji je prisoten v eritrocitih in deluje kot receptor za laminin (Gauthier idr., 2010).

Območje okoli gena *APOE* je pogosto med najbolj statistično pomembno povezanimi območji genoma z AB, v asociacijskih študijah celotnega genoma. V tem območju se nahajajo tudi geni: *APOC1*, *APOC1P1* in *TOMM40*. Slednji v naših rezultatih ni bil prisoten. V *APOE* gruči je alel ApoE E4 najbolj statistično pomembno povezan z AB. Nekatere raziskave nakazujejo, da lahko *APOC1* in *TOMM40* tudi povečujeta tveganje za razvoj AB (Cervantes idr., 2011; Karch idr., 2014; Pimenova idr., 2018; Shao idr., 2017).

Gen *CLPTMI* vsebuje zapis za membranski protein, udeležen v regulacijo GABA-ergične signalizacije z omejevanjem količine receptorjev na celični membrani. To funkcijo opravlja z vezavo na podenote GABA<sub>A</sub> receptorja in zadrževanjem receptorjev v endoplazemskem retikulumu in golgijevem aparatu (Ge idr., 2018).

Gen evkariontskega iniciacijskega dejavnika 5A (*EIF5A*) vsebuje zapis za protein, ki deluje kot prepisovalni dejavnik, udeležen v fazo podaljševanja pri sintezi mRNA. Obstaja v dveh izooblikah (*EIF5A1* in *EIF5A2*), od katerih je *EIF5A1* izražena v velikih količinah v večini celic, medtem ko je *EIF5A2* v normalnem tkivu dokaj redka. Obe izoobliki sta v visokih količinah prisotni pri različnih oblikah raka (Chu, Cargnello, Topisirovic, & Pelletier, 2016; Mathews & Hershey, 2015). *EIF5AP3* je eden od psevdogenov *EIF5A*.

Gen *BLOC1S3* vsebuje zapis za eno od osmih podenot proteinskega kompleksa *BLOC1*. Ta kompleks sodeluje pri razvrščanju in transportu proteinov (Setty idr., 2007). V bližini *BLOC1S3* leži gen *NKPD1*, ki vsebuje zapis za protein, vpleten v sintezo sfingolipidov. Mutacije v genu *NKPD1* so bile statistično pomembno povezane z depresijo (Amin idr., 2017). Drugi gen v neposredni bližini *BLOC1S3* je *TRAPPC6A*, ki vsebuje zapis za eno od podenot kompleksa TRAPP. V miših je podenota *TRAPPC6A* udeležena v vezikularni transport in nastanek melanosomov. Mutacije v genu *TRAPPC6A* so povezane s spremembami v pigmentaciji kože in očesa (Gwynn, Smith, Rowe, Taylor, & Peters, 2006).

Seshadri idr. (2010) so gen *EXOC3L2* statistično pomembno povezali z AB. Naj idr. (2011) so sicer tudi dobili statistično pomembno povezavo znotraj območja genoma, v katerem se ta gen nahaja, vendar ta povezava ni bila več statistično pomembna ob vključitvi genotipa ApoE v analizo. Genotip *EXOC3L2* prav tako ni bil statistično pomembno povezan s starostjo ob pojavu bolezni in čeprav je bil statistično pomembno povezan z začetnim upadom v rezultatu KPSS, ta vpliv ni statistično pomemben pri bolnikih v obdobju dveh do treh let po vzpostavitvi diagnoze. Razlika v frekvenci alelov gena *EXOC3L2* med populacijo z AB in zdravimi osebami ni bila zaznana niti na Kitajskem. Liu idr. (2012) razliko med rezultati pripisujejo genetskim razlikam med populacijami, vključenimi v različne raziskave. Obenem lahko mutacije v *EXOC3L2* samo malo prispevajo k tveganju za razvoj AB (Liu idr., 2012; Naj idr., 2011; Schmidt idr., 2014; Seshadri idr., 2010).

## 6. Zaključek

Raziskava je bila razdeljena na dva dela in je posledično imela dva cilja:

1. določiti frekvence alelov ApoE pri bolnikih z AB v Sloveniji,
2. najti nove potencialne biološke označevalce v že obstoječih podatkovnih zbirkah, ki bi jih bilo možno uporabiti pri diagnosticiranju verjetne AB.

Glede na cilja, sta bili postavljeni dve hipotezi:

1. frekvence genotipov ApoE se ne razlikujejo statistično pomembno od frekvenc genotipov v evropski populaciji bolnikov z verjetno AB,
2. z metaanalizo bomo opredelili širši nabor potencialnih bioloških označevalcev verjetne AB, od katerih so bili nekateri že potrjeni v neodvisnih študijah, drugi pa predstavljajo nove kandidatne označevalce.

Prvi del naloge je bil osredotočen na genotipizacijo ApoE v slovenski populaciji bolnikov z verjetno AB. V raziskavo je bilo vključenih 113 bolnikov, od katerih je bilo v analizi uporabljenih le 74. Vzorca z diagnozama demence AB tipa in verjetne AB sta vključevala enajst oseb in eno osebo v zaporedju, kar je bilo premalo, da bi bila lahko vključena v analizo. Iz tega stališča prvi cilj ni bil dosežen. Kljub temu je bila opravljena primerjava treh diagnoz z največjim vzorcem: blaga kognitivna motnja, kognitivni upad in subjektivna kognitivna pritožba. Kot pričakovano, se tri diagnoze razlikujejo po starosti in po rezultatih testov kognicije. Zanimivo je, da ni bilo opažene razlike v pojavnostih genotipov in alelov ApoE med skupinami, vključenimi v analizo. Genotipizirana populacija se je statistično pomembno razlikovala od splošne evropske populacije po frekvenci genotipov ApoE E4/- in frekvenci genotipov ApoE E2/-. S tem je bila prva hipoteza ovržena. Raziskava bo v prihodnje vključila dodatne vzorce s postavljenimi diagnozami. Povečanje števila oseb, vključenih v raziskavo, bo odpravilo pomanjkanje statistične moči v analizi.

V drugem delu so bili zbrani rezultati šestih asociacijskih študij polimorfizmov posameznih nukleotidov celotnega genoma in nato vključeni v metaanalizo, z uporabo spletnega orodja za integracijo rezultatov visoko zmogljivih tehnik. V področjih z rezultatom  $-\log_{10}p$ -vrednost višjim od 8 se nahaja devetnajst genov. Izbrani geni so bili preverjeni na neodvisnih podatkih iz literature, pri čemer jih je bilo od devetnajstih le sedem predhodno povezanih s katerim koli tipom AB. Locus gena ApoE je kot pričakovano bil v skupini dobljenih devetnajst genov. Z metaanalizo je bil drugi cilj delno dosežen. Za popolni doseg cilja, bi morali biti rezultati metaanalize preverjeni z genotipizacijo dobljenih genov pri populaciji z verjetno AB in populaciji zdravih oseb. S preverjanjem na neodvisnih podatkih iz literature je bila druga hipoteza potrjena. Od devetnajst dobljenih genov je bilo sedem genov že potrjenih v neodvisnih študijah, medtem ko dvanajst genov predstavlja nove kandidatne označevalce za verjetno AB.

## 7. Literatura

- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., . . . Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 270–279. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008
- Amaro, A., Petretto, A., Angelini, G., & Pfeffer, U. (2016). Advancements in Omics Sciences. 67–108. doi:10.1016/b978-0-12-803460-6.00004-0
- Amin, N., Belonogova, N. M., Jovanova, O., Brouwer, R. W., van Rooij, J. G., van den Hout, M. C., . . . van Duijn, C. M. (2017). Nonsynonymous Variation in NKPD1 Increases Depressive Symptoms in European Populations. *Biol Psychiatry*, 81(8), 702–707. doi:10.1016/j.biopsych.2016.08.008
- Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S., & Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 9, 535–551. doi:10.2147/CIA.S51571
- Barnes, D. E., & Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*, 10(9), 819–828. doi:10.1016/S1474-4422(11)70072-2
- Boackle, S. A. (2018). CR2. In S. Barnum & T. Schein (Eds.), *The Complement FactsBook (Second Edition)* ("Second Edition" ed., pp. 423 - 434): Academic Press.
- Bon, J., Koritnik, B., Bresjanac, M., Repovs, G., Pregelj, P., Dobnik, B., & Pirtosek, Z. (2013). Cost of disorders of the brain in Slovenia in 2010. *Zdravniški Vestnik-Slovenian Medical Journal*, 82(3), 164–175.
- Burnashev, N., & Szepetowski, P. (2015). NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Pharmacol*, 20, 73–82. doi:10.1016/j.coph.2014.11.008
- Campbell, N. L., Unverzagt, F., LaMantia, M. A., Khan, B. A., & Boustani, M. A. (2013). Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clin Geriatr Med*, 29(4), 873–893. doi:10.1016/j.cger.2013.07.009
- Cervantes, S., Samaranch, L., Vidal-Taboada, J. M., Lamet, I., Bullido, M. J., Frank-Garcia, A., . . . Pastor, P. (2011). Genetic variation in APOE cluster region and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging*, 32(11), 2107 e2107–2117. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.023
- Chang, T. P., & Vancurova, I. (2014). Bcl3 regulates pro-survival and pro-inflammatory gene expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Biochim Biophys Acta*, 1843(11), 2620–2630. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.07.012
- Chen, Y. C., Davidson, B., Cheng, C. C., Maitra, A., Giuntoli, R. L., 2nd, Hruban, R. H., . . . Shih Ie, M. (2005). Identification and characterization of membralin, a novel tumor-associated gene, in ovarian carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1730(2), 96–102. doi:10.1016/j.bbaexp.2005.06.008
- Chu, J., Cargnello, M., Topisirovic, I., & Pelletier, J. (2016). Translation Initiation Factors: Reprogramming Protein Synthesis in Cancer. *Trends Cell Biol*, 26(12), 918–933. doi:10.1016/j.tcb.2016.06.005
- Cuyvers, E., & Sleegers, K. (2016). Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol*, 15(8), 857–868. doi:10.1016/S1474-4422(16)00127-7
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3), 189–198.

## Literatura

- Garcia-Ptacek, S., Eriksdotter, M., Jelic, V., Porta-Etessam, J., Kareholt, I., & Manzano Palomo, S. (2016). Subjective cognitive impairment: Towards early identification of Alzheimer disease. *Neurologia*, *31*(8), 562–571. doi:10.1016/j.nrl.2013.02.007
- Gault, V. A., & McClenaghan, N. H. (2009). *Understanding Bioanalytical chemistry : principles and applications*. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Gauthier, E., El Nemer, W., Wautier, M. P., Renaud, O., Tchernia, G., Delaunay, J., . . . Colin, Y. (2010). Role of the interaction between Lu/BCAM and the spectrin-based membrane skeleton in the increased adhesion of hereditary spherocytosis red cells to laminin. *Br J Haematol*, *148*(3), 456–465. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07973.x
- Ge, Y., Kang, Y., Cassidy, R. M., Moon, K. M., Lewis, R., Wong, R. O. L., . . . Craig, A. M. (2018). Clptm1 Limits Forward Trafficking of GABAA Receptors to Scale Inhibitory Synaptic Strength. *Neuron*, *97*(3), 596-610 e598. doi:10.1016/j.neuron.2017.12.038
- Gwynn, B., Smith, R. S., Rowe, L. B., Taylor, B. A., & Peters, L. L. (2006). A mouse TRAPP-related protein is involved in pigmentation. *Genomics*, *88*(2), 196–203. doi:10.1016/j.ygeno.2006.04.002
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., . . . Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, *41*(10), 1088–1093. doi:10.1038/ng.440
- Herukka, S. K., Simonsen, A. H., Andreasen, N., Baldeiras, I., Bjerke, M., Blennow, K., . . . Waldemar, G. (2017). Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement*, *13*(3), 285–295. doi:10.1016/j.jalz.2016.09.009
- Heymann, R. E., Paiva, E. S., Martinez, J. E., Helfenstein, M., Jr., Rezende, M. C., Provenza, J. R., . . . Souza, E. J. R. (2017). New guidelines for the diagnosis of fibromyalgia. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, *57 Suppl 2*, 467–476. doi:10.1016/j.rbre.2017.07.002
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., . . . Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, *43*(5), 429–435. doi:10.1038/ng.803
- Humphries, C., Kohli, M. A., Whitehead, P., Mash, D. C., Pericak-Vance, M. A., & Gilbert, J. (2015). Alzheimer disease (AD) specific transcription, DNA methylation and splicing in twenty AD associated loci. *Mol Cell Neurosci*, *67*, 37–45. doi:10.1016/j.mcn.2015.05.003
- Jack, C. R., Jr., Albert, M. S., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carrillo, M. C., . . . Phelps, C. H. (2011). Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *7*(3), 257–262. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.004
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 1–18). Boston: Academic Press.
- Jones, E., Oliphant, T., & Peterson, P. (2001). SciPy: Open Source Scientific Tools for Python. Retrieved from <http://www.scipy.org/>
- Kalaria, R. N., Maestre, G. E., Arizaga, R., Friedland, R. P., Galasko, D., Hall, K., . . . World Federation of Neurology Dementia Research, G. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol*, *7*(9), 812–826. doi:10.1016/S1474-4422(08)70169-8
- Karch, C. M., Cruchaga, C., & Goate, A. M. (2014). Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron*, *83*(1), 11–26. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.041



- Kuespert, K., Pils, S., & Hauck, C. R. (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5), 565–571. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.008
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., . . . Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41(10), 1094–1099. doi:10.1038/ng.439
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., . . . Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 45(12), 1452–1458. doi:10.1038/ng.2802
- Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*, 9(2), 106–118. doi:10.1038/nrneuro.2012.263
- Liu, Q. Y., Miao, D., Yu, J. T., Xing, Y. Y., Zhong, X. L., Wu, Z. C., . . . Tan, L. (2012). Lack of association between rs597668 polymorphism near EXOC3L2 and late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurosci Lett*, 513(2), 174–177. doi:10.1016/j.neulet.2012.02.030
- Liu, R., & Jin, J. P. (2016). Deletion of calponin 2 in macrophages alters cytoskeleton-based functions and attenuates the development of atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 99, 87–99. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.08.019
- Ly, P. T., Tang, S. J., & Roca, X. (2017). Alternative polyadenylation expands the mRNA isoform repertoire of human CD46. *Gene*, 625, 21–30. doi:10.1016/j.gene.2017.05.004
- Mathews, M. B., & Hershey, J. W. (2015). The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1849(7), 836–844. doi:10.1016/j.bbagr.2015.05.002
- Maver, A. (2016). *Sinteza heterogenih genomskih podatkov pri odkrivanju dednih dejavnikov za multifaktorske bolezni*. (Interdisciplinarni doktorski študijski program biomedicina), Univerza v Ljubljani, Ljubljana.
- Maver, A., & Peterlin, B. (2011). Positional integratomic approach in identification of genomic candidate regions for Parkinson's disease. *Bioinformatics*, 27(14), 1971–1978. doi:10.1093/bioinformatics/btr313
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939–944.
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, 51–56.
- Michaelson, D. M. (2014). APOE epsilon4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 10(6), 861–868. doi:10.1016/j.jalz.2014.06.015
- MOLBIOL, T. (2017). LightMix® Kit ApoE C112R R158C. Berlin, Nemčija.
- Mülhardt, C. (2007). *Molecular biology and genomics*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L. S., Vardarajan, B. N., Buross, J., . . . Schellenberg, G. D. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 43(5), 436–441. doi:10.1038/ng.801
- Nasreddine, Z. S., Phillips, N. A., Bedirian, V., Charbonneau, S., Whitehead, V., Collin, I., . . . Chertkow, H. (2005). The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*, 53(4), 695–699. doi:10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x
- Oliphant, T. E. (2006). *A guide to NumPy*. USA: Trelgol Publishing.

## Literatura

- Ono, K. (2017). Alzheimer's disease as oligomeropathy. *Neurochem Int*, doi:10.1016/j.neuint.2017.08.010
- Park, D. C., Glass, J. M., Minear, M., & Crofford, L. J. (2001). Cognitive function in fibromyalgia patients. *Arthritis Rheum*, 44(9), 2125–2133. doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2125::AID-ART365>3.0.CO;2-1
- Perez, F., & Granger, B. E. (2007). IPython: A system for interactive scientific computing. *Computing in Science & Engineering*, 9(3), 21-29. doi:Doi 10.1109/Mcse.2007.53
- Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., & Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med*, 275(3), 214–228. doi:10.1111/joim.12190
- Pierce, A. L., Bullain, S. S., & Kawas, C. H. (2017). Late-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin*, 35(2), 283–293. doi:10.1016/j.ncl.2017.01.006
- Pimenova, A. A., Raj, T., & Goate, A. M. (2018). Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry*, 83(4), 300-310. doi:10.1016/j.biopsych.2017.05.014
- Profenno, L. A., Porsteinsson, A. P., & Faraone, S. V. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry*, 67(6), 505–512. doi:10.1016/j.biopsych.2009.02.013
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, 88(4), 640–651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024
- Roche. (2017). DNA Isolation Kit for Mammalian Blood. Pridobljeno s [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General\\_Information/1/dna-isolation-kit-for-mammalian-blood.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/dna-isolation-kit-for-mammalian-blood.pdf)
- Sanford, A. M. (2017). Mild Cognitive Impairment. *Clin Geriatr Med*, 33(3), 325–337. doi:10.1016/j.cger.2017.02.005
- Schmidt, C., Wolff, M., von Ahnen, N., Lange, K., Friede, T., & Zerr, I. (2014). CR1 is potentially associated with rate of decline in sporadic Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci*, 21(10), 1705–1708. doi:10.1016/j.jocn.2014.03.015
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., . . . Consortium, E. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303(18), 1832–1840. doi:10.1001/jama.2010.574
- Setty, S. R., Tenza, D., Truschel, S. T., Chou, E., Sviderskaya, E. V., Theos, A. C., . . . Marks, M. S. (2007). BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell*, 18(3), 768–780. doi:10.1091/mbc.E06-12-1066
- Shao, W., Peng, D., & Wang, X. (2017). Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *J Clin Neurosci*, 45, 1–8. doi:10.1016/j.jocn.2017.06.074
- Stephenson, F. H. (2016). *Calculations for molecular biology and biotechnology* (Third edition. ed.). Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Tzeng, N. S., Chung, C. H., Liu, F. C., Chiu, Y. H., Chang, H. A., Yeh, C. B., . . . Chien, W. C. (2018). Fibromyalgia and Risk of Dementia-A Nationwide, Population-Based, Cohort Study. *Am J Med Sci*, 355(2), 153–161. doi:10.1016/j.amjms.2017.09.002
- Verheijen, J., & Sleegers, K. (2018). Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics. *Trends Genet*, 34(6), 434–447. doi:10.1016/j.tig.2018.02.007
- Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C. J., Collins, J. M., Boyd, D., Cook, M. N., & Arrighi, H. M. (2012). Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among

- patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 38(1), 1-17. doi:10.1159/000334607
- Wetzel, S., Seipold, L., & Saftig, P. (2017). The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta*, 1864(11 Pt B), 2071–2081. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.06.005
- Wimo, A., Ballard, C., Brayne, C., Gauthier, S., Handels, R., Jones, R. W., . . . Kramberger, M. (2014). Health economic evaluation of treatments for Alzheimer's disease: impact of new diagnostic criteria. *J Intern Med*, 275(3), 304–316. doi:10.1111/joim.12167
- Wimo, A., Jonsson, L., Gustavsson, A., McDaid, D., Ersek, K., Georges, J., . . . Valtonen, H. (2011). The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project. *Int J Geriatr Psychiatry*, 26(8), 825–832. doi:10.1002/gps.2610
- Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., & Kuroda, S. (2016). Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol*, 34(4), 276–290. doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.013

## Zahvala

Na prvem mestu se zahvaljujem svoji mentorici profesorici Damjani Rozman za podporo pri izvedbi naloge. Hvala Vam tudi za kritičnost od prvega dne planiranja naloge. Brez Vas celotno delo ne bi potekalo tako gladko, kot je sicer.

Naslednja zahvala gre somentorju, doktor Zvezdanu Pirtošku. Hvala, ker ste mi omogočili se delovno izpopolnjevati tudi izven magistrskega dela. Poleg tega bi se rad zahvalil tudi za Vašo pomoč pri nalogi. V zadnjih fazah administrativnega postopka je bila še posebej neprecenljiva.

Nadalje gre zahvala mojim trem neprecenljivim dobrim vilam. Urši Kovač se zahvaljujem za pomoč pri vzpostavljanju metode in prvih testiranjih. Hvala tudi Uršuli Prosenc Zmrzljak za vso tehnično pomoč med tekom dela. Nenazadnje pa velika hvala tudi Alji Videtič Paska. Poskrbela si za uspešen zaključek mojega dela in uspešen prevzem celotne metode. Hvala ti tudi za vse pogovore, kritike in nasvete.

Hvala Nejcju Nadižarju za njegovo uho in predvsem budno oko. Celotnega sistema za obdelavo vzorcev ne bi bilo brez tebe, moje delo pa bi bilo veliko bolj trdo in z veliko več napakami. Poleg tega se ti zahvaljujem za vse pogovore. Bili so mi v veselje.

Kolikor je magistrska naloga konec enega obdobja, je tudi pričetek drugega. Zato se moram zahvaliti tu tudi Margot Ernst. Hvala za potrpljenje, pogovore, debate in hvala za nasvete. Predvsem pa hvala, ker ste počakali name. Na tem mestu gre zahvala tudi vsem članom skupine, kot tudi celotnega oddelka. Veliko morje majhnih stvari, ki olepšajo dan.

Nobena zahvala pa ni popolna brez omembe prijateljev in družine. Hvala za vse trenutke in podporo. Ob vas se mi zdi svet vsaj malo manjši, kot je v resnici.

# Dodatek 1: Izjava o zavestni in svobodni privolitvi za sodelovanje v raziskavi

Nevrološka klinika  
Zaloška cesta 2  
1000 Ljubljana



## IZJAVA O ZAVESTNI IN SVOBODNI PRIVOLITVI ZA SODELOVANJE

### Preiskovanec:

Priimek:

Ime:

### Zdravnik:

Priimek:

Ime:

Danes so mi v pogovoru razložili naravo in pomen preiskav v sklopu študije »**Odkrivanje genetskih biooznačevalcev pri Alzheimerjevi bolezni**«. Seznanili so me s koristmi, nevšečnostmi in tveganji preiskav, pri čemer sem imel/imela možnost vprašati kakršno koli vprašanje. Razumem informacijo in pristajam na predlagane preiskave.

Zavedam se, da lahko kadar koli prekličem svoj pristanek, ne da bi navedel/navedla razloge za to.

Datum:

Podpis preiskovanca/preiskovanke:

Podpis zdravnika:

ŠIFRA:

# Dodatek 2: Izjava o lektoriranju magistrskega dela

## IZJAVA O LEKTORIRANJU MAGISTRSKEGA DELA V SLOVENSKEM JEZIKU

Podpisani-a \_\_\_\_\_ Sara Vizler \_\_\_\_\_

(ime in priimek)

\_\_\_\_\_ absolvent enopredmetne slovenistike, Univerze v Ljubljani \_\_\_\_\_

(izobrazba)

IZJAVLJAM, da sem lektoriral-a magistrsko delo študenta-ke

\_\_\_\_\_ Jureta Fabjana \_\_\_\_\_

(ime in priimek študenta-ke)

z naslovom: \_\_\_\_\_ Biološki označevalci verjetne Alzheimerjeve bolezni \_\_\_\_\_

Kraj in datum:

\_\_\_\_\_ Krško, 23. 8. 2018 \_\_\_\_\_

Podpis lektorja:

\_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_