

mgr Angelika Długosz

**Związek locus 2p24.2 z przerostem lewej komory serca
u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
uzupełniona i poprawiona zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych
(Rozporządzenie MNiSzW § 6 pkt 6)**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego
i Angiologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Wstęp

Zwężenie zastawki aortalnej jest trzecią pod względem częstości (po nadciśnieniu tętniczym i chorobie niedokrwiennej serca) patologią układu sercowo-naczyniowego i obejmuje 12.4% osób po 75 roku życia. Objawowe zwężenie zastawki aortalnej utrudnia odpływ krwi z lewej komory, co prowadzi do przerostu mięśnia lewej komory serca, który jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu. Z powodu braku wyraźniej zależności między stopniem zwężenia zastawki aortalnej a przerostem mięśnia lewej komory serca wysunięto hipotezę, że jest on uwarunkowany czynnikami genetycznymi. Hipoteza ta została potwierdzona w badaniach dotyczących dziedziczności wymiarów serca na różnych populacjach wśród osób bez pokrewieństwa jak również spokrewnionych.

W literaturze istnieje tylko kilka publikacji dotyczących związku zmienności genetycznej ze stopniem przerostu lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej. Brak jest doniesień oceniających cały genom lub związek polimorfizmów genetycznych w obrębie locus 2p24.2 z przerostem serca w tej grupie chorych.

Badania całego genomu przy użyciu 500 000 markerów przeprowadzone przez nasz zespół, we współpracy z Kliniką Wad Nabytych Serca Instytutu Kardiologii, wykazały związek kilkudziesięciu obszarów genomu z masą lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej a jednym z najistotniejszych z nich jest obszar p24.2 chromosomu 2.

Cel

Celem pracy jest określenie czynników genetycznych i mechanizmów molekularnych związanych z przerostem mięśnia lewej komory serca w locus 2p24.2 wyznaczonym przez badanie całego genomu (GWAS) u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej.

Materiały i metody

Grupę badaną stanowią chorzy hospitalizowani w Klinice Wad Nabytych Serca Instytutu Kardiologii w Warszawie, u których w okresie 1997-2005 wszczepiono sztuczną zastawkę w ujście aortalne i którzy pozostają pod stałą opieką Poradni Przyklinicznej. Kryterium włączenia do badania: a) rozpoznanie istotnego zwężenia zastawki aortalnej, na podstawie badania podmiotowego, przedmiotowego, potwierdzone badaniem echokardiograficznym, b) wiek 30-75 lat. Kryterium wykluczenia z badania: współistniejące: a) umiarkowana lub istotna niedomykalność zastawki aortalnej, b) wady pozostałych zastawek, c) wywiad wyczynowego uprawiania sportu w przeszłości. Badaniami została

objęta grupa 657 pacjentów, spełniających powyższe kryteria. Masa mięśnia lewej komory serca została obliczona za pomocą wzoru wg. Deveraux.

Oznaczanie genotypów poszczególnych polimorfizmów jest wykonywane metodą pomiaru kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), z sondami TaqMan przy użyciu aparatu ViiA7. Polimorfizmy zostały ocenione pod względem odstępstwa od równowagi Hardy-Weinberga a wyznaczanie haplobloków jest wykonywane za pomocą programu Haploview 4.2. Uogólnione modele liniowe stosuje się w celu oceny związku wytypowanych polimorfizmów, płci i wieku (model prosty) oraz pozostałych zmiennych klinicznych tj. frakcja wyrzutowa, maksymalny gradient przez zatawkę (model pełny) z indeksem masy lewej komory serca (LVM/BSA). Do analizy haplotypów są wykorzystywane programy plink 1.07. Analiza imputacji, wykonana w programach IMPUTE2 i SNPTEST w oparciu o bazę danych 1000 Genomes Project phase3 oraz sekwencjonowanie wybranego obszaru (egzonów, intronów oraz obszarów promotorowych), wykonane za pomocą sekwencjonowania nowej generacji w systemie IonProton pozwoliło zidentyfikować potencjalne polimorfizmy funkcjonalne. Zostały one poddane analizie pod względem ich wpływu na stabilność oraz ilość powstającego RNA (algorytmy RNAfold oraz RNAplfold) oraz wiązania miRNA (mrSNP). Przeprowadzono również badania ekspresji genów w hodowli komórek linii H9c2 podczas stymulacji czynnikami prohipertroficznymi oraz w różnym stężeniu tlenu.

Wyniki

Do opisu pełnej zmienności genetycznej w obrębie badanego haplobloku w locus 2p24 niezbędne są 4 polimorfizmy znacznikowe. Dwa z nich, rs12997119, rs7573656, wykazały związek z LVM/BSA w modelu prostym (odpowiednio $p=0,00585$ i $p=0,00035$) a zależności te pozostały istotne po uwzględnieniu zmiennych klinicznych (odpowiednio $p=0,00340$ i $p=0,00066$). Zależność ta była szczególnie widoczna u mężczyzn a najlepiej opisywał ją model genetyczny dominujący. Analiza haplotypów wykazała, że w tym locus występują 4 częste haplotypy ($>5\%$), i każdy z nich wykazał związek (istotny statystycznie lub trend ($p<0.1$)) z indeksem masy lewej komory. Haplotyp h1.TGTG o częstości wstępowania 49,5% wykazał związek z niższym LVM/BSA zarówno w modelu prostym ($p=0,00061$) jak również w modelu pełnym ($p=0,00017$). Haplotyp h3.CACC o częstości wstępowania 16,5% wykazał związek z wyższym LVM/BSA zarówno w modelu prostym ($p=0,03320$) jak również w modelu pełnym ($p=0,01720$). Wyniki analizy haplotypów potwierdzają i uzupełniają wyniki otrzymane z pojedynczych polimorfizmów. Haplotyp h1.TGTG związany z niższym

LVM/BSA jest wyznaczony przez częsty allel T polimorfizmu rs10195641, którego allel przeciwny C, w analizie pojedynczych polimorfizmów miał związek z wyższym LVM/BSA. Haplotyp h3.CACC wykazujący zależność z większą masą lewej komory jest wyznaczony przez rzadki allel A rs7573656, lub rzadki allel C rs12997119, oba związane z wyższym LVM/BSA w analizie poszczególnych polimorfizmów. W celu wykrycia potencjalnego polimorfizmu funkcjonalnego wybrano po 7 osób będących homozygotami dla każdego z haplotypów i dla tej 14 osobowej grupy przeprowadzono sekwencjonowanie różnicowe. Analiza imputacji oraz potencjalnych funkcji biologicznych dla znalezionych 245 polimorfizmów ujawniła 6 istotnych polimorfizmów, które występują w regionie 3' genu *FAM49A* (Family With Sequence Similarity 49, Member A) nie ulegającym translacji. Dwa z nich (SNP1 i SNP2) istotnie zmieniały wyliczone teoretycznie energie formowania się struktur II rzędowych RNA (p value odpowiednio $p=0.0298$ oraz $p=0.0311$) co może wpływać na stabilność mRNA lub procesy translacji i w konsekwencji ilość wytwarzanego białka. Badanie stężenia mRNA w tkankach mięśnia lewej komory serca (uzyskanych śródoperacyjnie od chorych ze stenozą aortalną) w zależności od genotypu wybranych polimorfizmów nie wykazało istotnych różnic wskazujących na mniejszą stabilność lub zmniejszoną produkcję transkryptu co sugeruje, że funkcjonalne znaczenie badanych polimorfizmów może być wynikiem ingerowania w procesy translacji z mRNA do białka. Badanie związku polimorfizmów potencjalnie funkcjonalnych z cechami echokardiograficznymi pacjentów wykazały nieznacznie większą istotność polimorfizmu SNP1 niż SNP2. Ekspresja genu *FAM49A* w komórkach mioblastów szczurzych pochodzenia sercowego w warunkach hodowlanych z atmosferycznym stężeniem tlenu (21%) była na bardzo niskim poziomie, nawet po stymulacji czynnikami prohipertroficznymi. Dopiero hodowla w warunkach hipoksji (stężenie tlenu > 4%) zwiększyła ekspresję genu *FAM49A* około 10 000 razy.

Podsumowanie

Polimorfizmy genetyczne występujące w obszarze 3'UTR genu *FAM49A* wykazują związek z indeksem masy lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej. Ekspresja genu *FAM49A* jest zależna od stężenia tlenu. Przedstawione wyniki sugerują udział genu o nieznannej dotychczas funkcji - *FAM49A* w procesie przerostu mięśnia lewej komory serca u chorych ze stenozą aortalną. Dokładne wyjaśnienie mechanizmu molekularnego, w jakim mutacje w genie *FAM49A* wpływają na funkcję genu a także na przerost mięśnia lewej komory serca, wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań.

Angelika Dłupca

Grzegorz