

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina VRABEC

**GENETSKE IN EPIGENETSKE SPREMEMBE,  
POVEZANE Z AMIOTROFIČNO LATERALNO  
SKLEROZO V SLOVENSKI POPULACIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina VRABEC

**GENETSKE IN EPIGENETSKE SPREMEMBE, POVEZANE Z  
AMIOTROFIČNO LATERALNO SKLEROZO V SLOVENSKI  
POPULACIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES ASSOCIATED WITH  
AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN THE SLOVENIAN  
POPULATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Biomedicine, področja genetike. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Oddelku za molekularno genetiko, Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 13.11.2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem dokorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetike. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Metka Ravnik-Glavač.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Simon Horvat  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Boris Rogelj  
Inštitut Jožef Štefan, Odsek za biotehnologijo

Član: prof. dr. Borut Peterlin  
Klinični center Ljubljana, SPS Ginekološka klinika, Klinični inštitut za  
Medicinsko genetiko

Datum zagovora: 26.02.2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katarina Vrabec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dd                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| DK | 577.21:616-056.7(043.3)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| KG | ALS/genetika/ <i>SOD1</i> / <i>FUS</i> / <i>TARDBP</i> / <i>C9ORF72</i> /sekvenciranje/metilacija/MS-HRM/miRNA/qPCR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| AV | VRABEC, Katarina, univ. dipl. mikrobiol.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| SA | RAVNIK-GLAVAČ, Metka (mentor)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje genetike                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| LI | 2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| IN | GENETSKE IN EPIGENETSKE SPREMEMBE, POVEZANE Z AMIOTROFIČNO LATERALNO SKLEROZO V SLOVENSKI POPULACIJI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| TD | Doktorska disertacija                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| OP | X, 83 str., 12 pregl., 20 sl, 197 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| AI | Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neozdravljiva nevrodegenerativna bolezen, ki močno prizadene bolnika in njegove bližnje. Patologija bolezni ni razumljena, jasno pa je, da gre za preplet mnogih mehanizmov, vključujoč genetiko in epigenetiko. V naši študiji smo kot biološki material uporabili vzorce levkocitov periferne krvi slovenskih bolnikov z ALS. V genih <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> , <i>FUS</i> in <i>C9ORF72</i> smo zaznavali nukleotidne spremembe in ugotovili dve mutaciji v genu <i>SOD1</i> (p.Val14Met in p.Gly93Cys), ter dve sinonimni zamenjavi, eno v genu <i>FUS</i> (p.Arg522Arg) in eno novo odkrito v genu <i>TARDBP</i> (p.Leu330Leu). V genu <i>C9ORF72</i> smo pri 5-ih bolnikih ugotovili HREM. V skladu z drugimi študijami je gen <i>C9ORF72</i> najpogostejši genetski vzrok za bolezen tudi pri slovenskih bolnikih. Na področju metilacije smo na podlagi rezultatov analize metilacijskega profiliranja celotnega genoma na 4-ih vzorcih bolnikov izbrali 14 genov in jih nato validirali z metodo MS-HRM ter potrdili s sekvenciranjem po Sangerju. Pri 8-ih genih smo ugotovili metiliranost promotorja, pri ostalih 6-ih pa ne. Z metodo qPCR smo preverjali izražanje 10-ih izbranih miRNA. Odkrili smo zvišano izražanje let-7b, miR-132, miR-206- Zvišano se je izražala tudi miR-638, njen gostiteljski gen <i>DNM2</i> pa je bil znižano izražen. Ugotovili smo znižano izražanje miR-338 in njenega gostiteljskega gena <i>AATK</i> ter metiliranost promotorja gena <i>AATK</i> . MiR-9 se je pri bolnikih različno izražala, njen gostiteljski gen <i>C1ORF61</i> pa se v krvnih celicah ne izraža. Pri intergenskih miR-663a z različnim izražanjem in miR-124a z znižanim izražanjem smo z metodo MS-HRM ugotovili, da metiliranost promotorjev ni vzrok za njuno znižano izražanje. MiR-143 in miR-45a sta obe pokazali znižano izražanje, vendar v njunih promotorjih nismo našli CpG otočkov. Ta raziskava predstavlja prvo tovrstno študijo na področju bolezni ALS v slovenski populaciji. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd  
 DC 577.21:616-056.7(043.3)  
 CX ALS/genetics/*SOD1*/*FUS*/*TARDBP*/*C9ORF72*/sequencing/methylation/MS-HRM/miRNA/qPCR  
 AU VRABEC, Katarina  
 AA RAVNIK-GLAVAČ, Metka (supervisor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme of Biomedicine, Field of Genetics  
 PY 2016  
 TI GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES ASSOCIATED WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN THE SLOVENIAN POPULATION  
 DT Doctoral Dissertation  
 NO X, 83 p., 12 tab., 20 fig, 197 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease which greatly affects patients and their families. The disease pathology is uncertain, but it is clear that there are many mechanisms involved in the disease process. Our study was performed on leukocytes isolated from peripheral blood. Genetic analysis of *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72* genes revealed mutations p.Val14Met and p.Gly93Cys in *SOD1* gene and 2 synonymous substitutions, p.Arg522Arg in *FUS* gene and a novel change p.Leu330Leu in *TARDBP*. Screening of *C9ORF72* revealed HREM in 5 patients. In concordance with other studies HREM is the most common detected disease causing change. Methylation analysis was based on the results of the whole genome methylation profiling performed on 4 samples. 14 genes were selected and the results were validated by MS-HRM and confirmed by Sanger sequencing. Methylated promoters were detected in 8 genes, but the promoters of 6 genes were unmethylated. In the field of miRNA, qPCR was used to examine the expression of 10 miRNA. Increased expression of let-7b, miR-132 and miR-206 was detected. Increased expression of miR-638 was also detected and its host gene *DNM2* was found to be downregulated. Reduced expression of miR-338 and its host gene *AATK* was found. Promoter of *AATK* gene was found to be methylated. MiR-9 was differently expressed in ALS patients, but its host gene *C1ORF61* was not expressed in blood. Two intergenic miRNAs, miR-663a which had variable expression across samples and miR-124a whose expression was reduced, were analysed by MS-HRM. Results showed that methylation of their promoters is not the cause for reduced expression. MiR-143 and miR-451a both showed decreased expression, but no CpG islands were found in their promoters. This is the first such study of ALS in the Slovenian population and therefore represents a well needed contribution to knowledge in the field of ALS.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....                                                                                           | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) .....                                                                                                      | IV        |
| KAZALO VSEBINE.....                                                                                                                      | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC.....                                                                                                                   | VIII      |
| KAZALO SLIK.....                                                                                                                         | IX        |
| SLOVARČEK .....                                                                                                                          | X         |
| <b>1 UVOD .....</b>                                                                                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....                                                                                                           | 1         |
| 1.2 NAMEN RAZISKAVE.....                                                                                                                 | 1         |
| 1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE .....                                                                                                          | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                                                                                             | <b>3</b>  |
| 2.1 GENETSKI DEJAVNIKI .....                                                                                                             | 4         |
| 2.1.1 SOD1, prvi z ALS povezan gen .....                                                                                                 | 5         |
| 2.1.2 Odkritje genov <i>TARDBP</i> in <i>FUS</i> kaže na vpletenost okvarjenega procesiranja RNA pri propadanju motoričnih nevronov..... | 6         |
| 2.1.3 <i>C9ORF72</i> , prelomnica v raziskavah na področju ALS.....                                                                      | 7         |
| 2.2 EPIGENETIKA.....                                                                                                                     | 8         |
| 2.2.1 Regulacija uravnavanja izražanja genov preko mehanizma metilacije DNA .....                                                        | 9         |
| 2.2.1.1 Metilacija pri bolezni ALS .....                                                                                                 | 11        |
| 2.2.2 Procesiranje mikroRNA in njihova vloga pri izražanju genov.....                                                                    | 11        |
| 2.2.2.1 miRNA PRI ALS.....                                                                                                               | 13        |
| <b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>                                                                                                       | <b>16</b> |
| 3.1 BOLNIKI IN ZBIRANJE VZORCEV.....                                                                                                     | 16        |
| 3.2 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN IZ VZORCEV KRVİ IN PREVERJANJE KONCENTRACIJE.....                                                       | 16        |
| 3.2.1 Izolacija DNA.....                                                                                                                 | 16        |

|              |                                                                                                                                                                                                |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2.2</b> | <b>Ekstrakcija RNA .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>16</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>GENSKO PROFILIRANJE .....</b>                                                                                                                                                               | <b>17</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b>Vzorci in izbor genov za analizo .....</b>                                                                                                                                                  | <b>17</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Določevanje nukleotidnega zaporedja z metodo sekvenciranja po Sangerju pri genih <i>SOD1</i>, <i>FUS</i> in <i>TARDBP</i>.....</b>                                                          | <b>17</b> |
| 3.3.2.1      | Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....                                                                                                                                                       | 17        |
| 3.3.2.2      | Sekvenčna reakcija in sekvenciranje .....                                                                                                                                                      | 18        |
| <b>3.3.3</b> | <b>Gen <i>C9ORF72</i>; kapilarna elektroforeza in analiza dolžine fragmentov s pomočjo programa GeneScan .....</b>                                                                             | <b>19</b> |
| 3.3.3.1      | Reakcije verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) .....                                                                                                                                       | 20        |
| 3.3.3.2      | Kapilarna elektroforeza, analiza.....                                                                                                                                                          | 22        |
| 3.3.3.3      | Bioinformatika.....                                                                                                                                                                            | 23        |
| <b>3.4</b>   | <b>ANALIZA METILACIJSKEGA STATUSA .....</b>                                                                                                                                                    | <b>23</b> |
| <b>3.4.1</b> | <b>Vzorci.....</b>                                                                                                                                                                             | <b>23</b> |
| <b>3.4.2</b> | <b>Bisulfitna pretvorba in čiščenje produkta.....</b>                                                                                                                                          | <b>23</b> |
| <b>3.4.3</b> | <b>Metilacijsko profiliranje celotnega genoma in izbor genov za validacijo .....</b>                                                                                                           | <b>24</b> |
| <b>3.4.4</b> | <b>Validacija hipermetiliranih odsekov z metodo MS-HRM.....</b>                                                                                                                                | <b>25</b> |
| 3.4.4.1      | Izbira oligonukleotidnih začetnikov .....                                                                                                                                                      | 26        |
| 3.4.4.2      | Metilacijsko-specifična analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti.....                                                                                                               | 27        |
| 3.4.4.3      | Analiza rezultatov MS-HRM in potrjevanje z metodo sekvenciranja po Sangerju.....                                                                                                               | 28        |
| <b>3.5</b>   | <b>ANALIZA IZRAŽANJA miRNA IN NJIHOVIH GOSTITELJSKIH GENOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) TER ANALIZA METILIRANOSTI PROMOTORJEV miRNA ALI GOSTITELJSKIH GENOV .....</b> | <b>28</b> |
| <b>3.5.1</b> | <b>Vzorci in izbrane miRNA .....</b>                                                                                                                                                           | <b>29</b> |
| <b>3.5.2</b> | <b>Reakcija obratnega prepisovanja .....</b>                                                                                                                                                   | <b>29</b> |
| <b>3.5.3</b> | <b>Določevanje izražanja miRNA s kvantitativnim PCR (qPCR) v realnem času in statistična analiza rezultatov .....</b>                                                                          | <b>29</b> |
| 3.5.3.1      | Reakcije qPCR .....                                                                                                                                                                            | 29        |
| 3.5.3.2      | Statistična analiza rezultatov .....                                                                                                                                                           | 30        |

|              |                                                                                                                                                                                            |           |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.5.4</b> | <b>Določevanje izražanja gostiteljskih genov intragenskih miRNA.....</b>                                                                                                                   | <b>32</b> |
| <b>3.5.5</b> | <b>Določevanje metilacijskega statusa promotorjev intergenskih miRNA z<br/>znižanim izražanjem in promotorjev gostiteljskih genov miRNA z<br/>znižanim izražanjem z metodo MS-HRM.....</b> | <b>33</b> |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI .....</b>                                                                                                                                                                     | <b>34</b> |
| 4.1          | BOLNIKI IN NJIHOVI KLINIČNI PODATKI .....                                                                                                                                                  | 34        |
| 4.2          | SPREMEMBE V GENIH <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> , <i>FUS</i> IN <i>C9ORF72</i> .....                                                                                                         | 37        |
| 4.3          | METILACIJSKI STATUS GENOV PRI BOLNIKI Z ALS .....                                                                                                                                          | 38        |
| 4.3.1        | Metilacijsko profiliranje celotnega genoma.....                                                                                                                                            | 38        |
| 4.3.2        | Analiza metilacijskega statusa promotorjev z metodo MS-HRM in<br>sekvenciranjem po Sangerju .....                                                                                          | 40        |
| 4.4          | ANALIZA IZRAŽANJA miRNA IN NJIHOVIH GOSTITELJSKIH GENOV..                                                                                                                                  | 42        |
| 4.4.1        | Izražanje miRNA v vzorcih bolnikov z ALS in rezultati statistične analize..                                                                                                                | 42        |
| 4.4.2        | Izražanje gostiteljskih genov <i>C1ORF61</i> , <i>DNM2</i> in <i>AATK</i> intragenskih<br>miRNA.....                                                                                       | 47        |
| 4.4.3        | Analiza metilacijskega statusa promotorja gena <i>AATK</i> in intergenskih<br>miRNA.....                                                                                                   | 48        |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA.....</b>                                                                                                                                                                       | <b>49</b> |
| 5.1          | ANALIZA SPREMEMB V GENIH <i>SOD1</i> , <i>FUS</i> , <i>TARDBP</i> IN <i>C9ORF72</i> PRI<br>BOLNIKI Z ALS.....                                                                              | 49        |
| 5.2          | METILIRANOST GENOV PRI SLOVENSKIH BOLNIKI Z ALS .....                                                                                                                                      | 51        |
| 5.3          | PROFIL IZRAŽANJA miRNA PRI BOLNIKI Z ALS .....                                                                                                                                             | 54        |
| 5.3.1        | Izražanje miR-9, miR-338 in miR-638 ter njihovih gostiteljskih genov<br><i>C1ORF61</i> , <i>AATK</i> in <i>DNM2</i> .....                                                                  | 54        |
| 5.3.2        | Izražanje miR-663a in miR-124a ter miR-143 in miR-451a.....                                                                                                                                | 56        |
| 5.3.3        | Izražanje let-7b, miR-132 in miR-206 .....                                                                                                                                                 | 57        |
| <b>6</b>     | <b>SKLEPI .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>59</b> |
| <b>7</b>     | <b>POVZETEK (SUMMARY).....</b>                                                                                                                                                             | <b>61</b> |
| 7.1          | POVZETEK .....                                                                                                                                                                             | 61        |
| 7.2          | SUMMARY .....                                                                                                                                                                              | 63        |
| <b>8</b>     | <b>VIRI .....</b>                                                                                                                                                                          | <b>66</b> |

ZAHVALA

## KAZALO PREGLEDNIC

|                 |                                                                                                                                                                        |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1:  | Specifični začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje<br>genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo.....                                                    | 18 |
| Preglednica 2:  | Protokol etanol/natrijevega acetatnega obarjanja produktov sekvenčne<br>reakcije. ....                                                                                 | 19 |
| Preglednica 3:  | Specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje<br>heksanukleotidnih razširitev v intronu gena <i>C9ORF72</i> z verižno<br>reakcijo s polimerazo ..... | 21 |
| Preglednica 4:  | Protokol pomnoževanja gena <i>C9ORF72</i> po metodi RP-PCR.....                                                                                                        | 22 |
| Preglednica 5:  | Izbrani geni in specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni za<br>pomnoževanje bisulfitno pretvorjene DNA .....                                                    | 27 |
| Preglednica 6:  | MiRNA in njihovi specifični začetni oligonukleotidi .....                                                                                                              | 30 |
| Preglednica 7:  | Specifični začetni oligonukleotidi za referenčna gena <i>GAPDH</i> in <i>U6</i> . ..                                                                                   | 32 |
| Preglednica 8:  | Specifični začetni oligonukleotidi za določevanje metilacijskega<br>statusa promotorskih regij miRNA z metodo MS-HRM .....                                             | 33 |
| Preglednica 9:  | Klinični podatki bolnikov z ALS .....                                                                                                                                  | 34 |
| Preglednica 10: | Genetske spremembe, ki smo jih zaznali pri bolnikih z ALS, in njihovi<br>klinični podatki.....                                                                         | 37 |
| Preglednica 11: | Seznam izbranih 14 genov skupaj z značilnostmi, ki so razlog za<br>njihov izbor za nadaljnjo validacijo metilacijskega statusa<br>promotorjev .....                    | 40 |
| Preglednica 12: | Seznam analiziranih miRNA z metodo qPCR s pripadajočo regijo .....                                                                                                     | 43 |

## KAZALO SLIK

|           |                                                                                                                                                          |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1:  | Primerjava zdravega živčnega nevrona z obolelim (University of Chicago Medicine, 2015) .....                                                             | 3  |
| Slika 2:  | Časovnica odkrivanja genov pri dedni (FALS) in sporadični (SALS) obliki ALS (levo). Odstotek znanih genov pri obeh oblikah bolezni v Evropi (desno)..... | 5  |
| Slika 3:  | CpG otočki v promotorski regiji gena .....                                                                                                               | 9  |
| Slika 4:  | Trije tipi promotorjev glede na gostoto dinukleotidov CpG.....                                                                                           | 10 |
| Slika 5:  | Pot procesiranja miRNA .....                                                                                                                             | 12 |
| Slika 6:  | Spremembe v biogenezi in funkciji miRNA so lahko vzrok in/ali posledica patogeneze ALS .....                                                             | 15 |
| Slika 7:  | Princip pomnoževanja razširitev heksanukleotidnih ponovitev v genu <i>C9ORF72</i> z metodo RP-PCR (prirejeno po (Hantash in sod., 2010). ....            | 20 |
| Slika 8:  | Postopek deaminacije citozinov med bisulfitno pretvorbo DNA in PCR reakcija po obdelavi z bisulfitom. ....                                               | 24 |
| Slika 9:  | Postopek metilacijskega profiliranja celotnega genoma na čipu HiSeq 2000 (Illumina, ZDA) .....                                                           | 25 |
| Slika 10: | Shematski prikaz analize izražanja miRNA .....                                                                                                           | 31 |
| Slika 11: | Genetske spremembe, najdene pri bolnikih z ALS v genih <i>SOD1</i> , <i>FUS</i> in <i>TARDBP</i> .....                                                   | 38 |
| Slika 12: | Shematski prikaz izbora genov za validacijo z metodo MS-HRM glede na izbrane kriterije .....                                                             | 39 |
| Slika 13: | Primer analize gena <i>TFDP1</i> z metodo MS-HRM.....                                                                                                    | 41 |
| Slika 14: | Potrditve rezultatov MS-HRM z metodo sekvenciranja po Sangerju za gen <i>TFDP1</i> .....                                                                 | 42 |
| Slika 15: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) miRNA na vzorcih bolnikov z ALS .....                                                                                | 44 |
| Slika 16: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-9 .....                                                                                                          | 44 |
| Slika 17: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-338 (A) in miR-663a (B) .....                                                                                    | 45 |
| Slika 18: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-451a .....                                                                                                       | 46 |
| Slika 19: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-143 po spolu .....                                                                                               | 47 |
| Slika 20: | Relativne vrednosti izražanja (RVI) gostiteljskih genov <i>DNM2</i> (miR-638) in <i>AATK</i> (miR-338).....                                              | 48 |

## SLOVARČEK

**FALS:** dedna oblika bolezni ALS (angl. familial ALS)

**FTD:** frontotemporalna demenca (angl. frontotemporal dementia)

**HCP:** promotorji z visoko gostoto CpG-jev (angl. High-CpG density promoter)

**HREM:** razširitve heksanukleotidnih ponovitev v prvem intronu gena *C9ORF72* (angl. hexanucleotide repeat expansion)

**ICP:** promotorji s srednjo gostoto CpG-jev (angl. Intermediate-CpG density promoter)

**LCP:** promotorji z nizko gostoto CpG-jev (angl. Low-CpG density promoter)

**MS-HRM:** metilacijsko specifična analiza talilne krivulje pri visoki ločljivosti (angl. methyl-specific high resolution melt)

**RISC:** kompleks, ki s pomočjo RNA utiša izražanje mRNA (angl. RNA-induced silencing complex)

**RP-PCR:** Specifičen protokol pomnoževanja razširitev heksanukleotidnih ponovitev v genu *C9ORF72* (angl. repeat-primed PCR)

**qPCR, RT-PCR:** kvantitativni PCR v realnem času (angl. real-time PCR)

**SALS:** sporadična oblika bolezni ALS (angl. sporadic ALS)

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Amiotrofična lateralna skleroza je nevrodegenerativna bolezen, ki močno spremeni kvaliteto življenja bolniku in njegovim bližnjim ter zaenkrat še vedno spada med neozdravljive bolezni. Njena patologija ni povsem jasna, prav tako so vzroki za njen pojav pri večini primerov nepojasneni. Na pojav bolezni vplivajo genetski in tudi okoljski dejavniki, kot kaže pa pomembno vlogo igra tudi epigenetika (v veliki meri metilacija in miRNA). Z boleznijo so od odkritja prve mutacije v genu *SOD1* leta 1993 (Rosen, 1993) povezali že mnogo različnih genov. Nekateri med njimi spadajo med vzročne gene, medtem ko so v večini genov odkrili le kakšno spremembo in jih zato uvrščamo med t.i. kandidatne gene. Poleg mutacij v genu *SOD1* med najpogostejše dokazane genetske vzroke za bolezen ALS spadajo še mutacije v genih *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72*, vendar pa tudi spremembe v teh genih razložijo le par odstotkov bolezni in še to večinoma dedne oblike. Raziskovalci so bili po letih študija na pretežno genetskem področju in relativno majhnem odstotku razloženih primerov bolnikov ALS primorani razširiti področja raziskav. Usmerili so se predvsem na epigenetiko. Epigenetika na nek način predstavlja povezavo med genetiko in okoljskimi dejavniki, saj je epigenom edinstven za vsako celico in se tudi spreminja tekom življenja. Med epigenetske mehanizme spadajo metilacija DNA, modifikacije histonov, prerazporeditev kromatina, RNA editing in nekodirajoče RNA, vključno z miRNA.

Področje, ki ga pokrivajo raziskave in ga še bodo v prihodnosti, je izredno široko in kot tako bo verjetno zahtevalo še nekaj časa, preden bo mogoče sestaviti celotno sliko, ki bo lahko razložila tako vzroke bolezni, kot njen potek in seveda mehanizme, ki privedejo v bolezen. Razvoj učinkovitega zdravila bo takrat logična posledica vsega nakopičenega znanja, sestavljenega v celoto.

### 1.2 NAMEN RAZISKAVE

Namen prvega dela doktorske naloge je bil ugotoviti in opredeliti spremembe v genetskem zapisu bolnikov s klinično diagnosticirano boleznijo amiotrofična lateralna skleroza (ALS) v slovenski populaciji. Omejili smo se na gene *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72*, ki so najpogostejši genetski vzrok tako za dedno kot za sporadično obliko bolezni.

V drugem delu nas je zanimalo področje metilacije, ki spada med pomembne epigenetske mehanizme uravnavanja izražanja genov. Raziskav smo se lotili z namenom, da odkrijemo morebitne spremembe v metilacijskem statusu promotorjev nekaterih izbranih genov pri bolnikih z ALS.

Zadnji del doktorske naloge smo posvetili miRNA, saj je regulacija izražanja genov preko miRNA eden izmed najbolj pomembnih mehanizmov posttranskripcijske regulacije. Namen naloge je bil preveriti izražanje nekaterih miRNA, ki so že znane kot udeležene v procesu bolezni ALS, v krvi bolnikov z ALS. Želeli smo tudi preveriti, ali je zmanjšano izražanje miRNA posledica metiliranosti promotorja te miRNA ali pa metiliranosti promotorja gostiteljskega gena te miRNA.

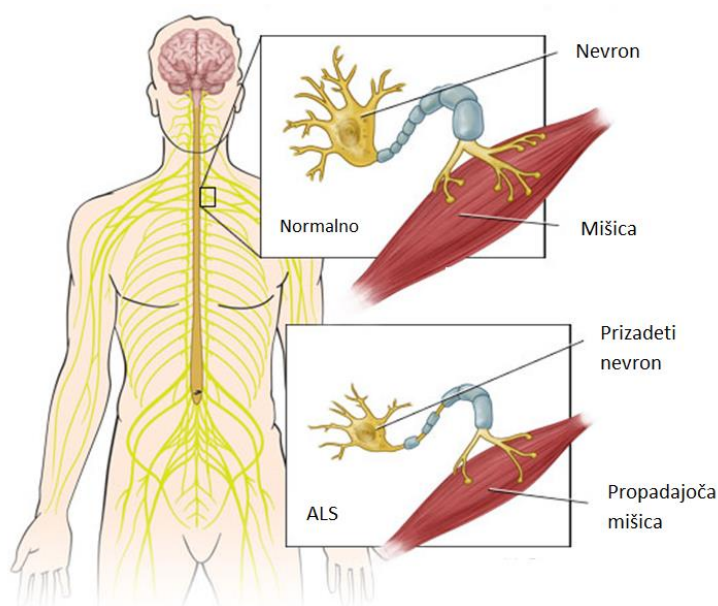
### 1.3 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

V okviru doktorske naloge smo postavili naslednje hipoteze:

- pogostost in razporeditev mutacij v genih *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* in *C9ORF72* se pri slovenskih bolnikih z ALS ne bo bistveno razlikovala od drugih evropskih populacij. Odkrili pa bomo kakšno novo spremembo, ki bo značilna za slovensko populacijo;
- odkrili bomo spremenjen metilacijski status nekaterih preiskovanih genov;
- odkrili bomo spremenjeno izražanje nekaterih miRNA, ki so vključene v molekularne procese, povezane s propadanjem nevronov. Znižano izražanje bo posledica povečane metilacije promotorja gostiteljskega gena intragenske miRNA ali promotorja intergenske miRNA.

## 2 PREGLED OBJAV

Amiotrofično lateralno sklerozo (ALS), ki je poznana tudi kot Lou Gehrigova bolezen, je prvi opisal Charcot leta 1869. Gre za kompleksno nevrodegenerativno bolezen, za katero je značilno propadanje zgornjih motoričnih nevronov v cerebralnem korteksu in spodnjih motoričnih nevronov v možganskem deblu in hrbtenjači (Slika 1). Klinično in genetsko spada med heterogene bolezni (Bocci in sod., 2011), ki je zaenkrat neozdravljiva. Najpogostejše se pojavi v odrasli dobi okoli 60. leta starosti z značilnimi simptomi, kot so mišična šibkost, atrofija mišic in kasneje mišična paraliza, ki privede do smrti zaradi dihalne nezadostnosti v 2-5 letih po pojavu prvih simptomov (Rowland in Shneider, 2001). Ti se pri približno 2/3 bolnikov najprej pojavijo v mišicah zgornjih in spodnjih okončin (spinalna oblika bolezni), pri 1/3 bolnikov pa v mišicah, ki jih potrebujemo za govor in požiranje slin (bulbarna oblika bolezni) (Wijesekera in Leigh, 2009). Pri približno 10 % bolnikov se bolezen začne pred 45. letom in pri okoli 1 % bolnikov že pred 25. letom starosti. Spada med redke bolezni z incidenco 2,16 novih primerov na 100.000 ljudi na leto (Logroscino in sod., 2010). Prevalenca pa je nekje med 5 in 6 ljudi na 100.000 prebivalcev (Chio in sod., 2013).



**Slika 1:** Primerjava zdravega živčnega nevrona z obolelim (University of Chicago Medicine, 2015). Zdrav živčni nevron zagotavlja ustrezen signal do tarčne mišice, medtem ko pri obolelem prihaja do propadanja živčnih vlaken, kar mišici ne zagotavlja zadostnih živčnih signalov in vodi v njeno propadanje.

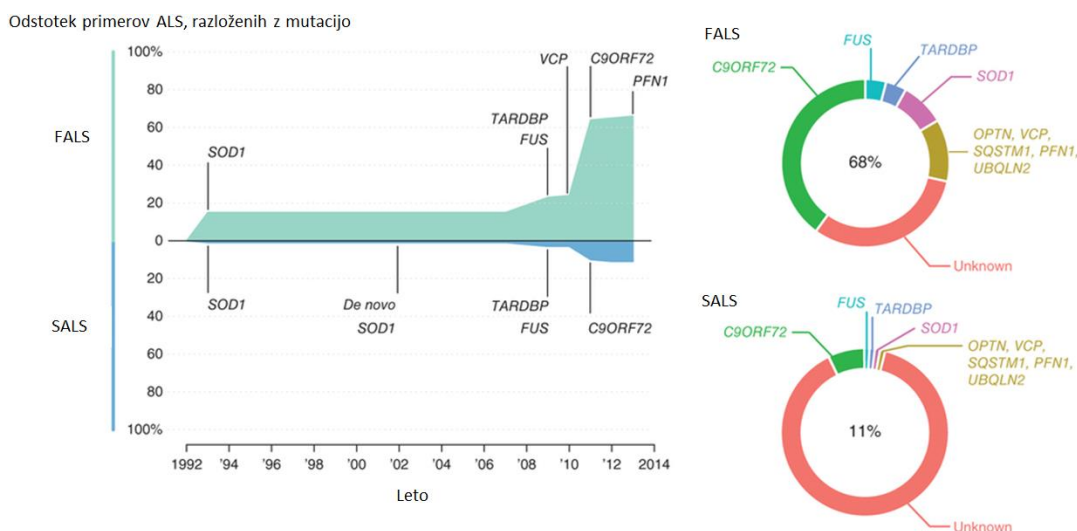
**Figure 1:** Healthy neuron compared to diseased one (University of Chicago Medicine, 2015). Healthy nerve fiber provides signal to target muscle whereas the diseased one lacks its proper function which leads to muscle wasting.

## 2.1 GENETSKI DEJAVNIKI

ALS je pretežno sporadična bolezen (angl. sporadic ALS, SALS), pri približno 10 % bolnikov pa se pojavlja dedna oblika (angl. familial ALS, FALS). Čeprav ni končnega kriterija za dedno obliko bolezni, je sprejet splošni dogovor, da prisotnost bolezni pri dveh sorodnikih prvega ali drugega reda predstavlja družinsko obliko bolezni (Leblond in sod., 2014).

Ideja, da so v nastanek ALS vključeni genetski dejavniki, je prvič vzniknila v letih 1850, ko so poročali o številnih družinah, v katerih je zbolelo več sorodnikov (Strong in sod., 1991). V študijah, ki so vključevale blizu dvesto parov dvojčkov, od katerih je bil v paru vsaj en bolnik z ALS, so ocenili prispevek dednosti na okoli 76 %, kadar so upoštevali pare dvojčkov iz sporadičnih in družinskih primerov skupaj, in na okoli 61 %, kadar so upoštevali le sporadične primere. Ta najdenja nakazujejo, da tako pri družinski obliki (FALS), kakor tudi pri sporadični obliki (SALS), na nastanek bolezni ključno vpliva genetski dejavnik (Aaltonen in sod., 1993). Številne dedne oblike ALS imajo klasičen način dedovanja po Mendlu, večinoma na avtosomno dominanten način z visoko stopnjo penetrance, čeprav so opisani tudi primeri recesivnega in na X-kromosom vezanega dedovanja (Deng in sod., 2011). S pomočjo metodologije genetske vezave je mogoče pri družinskih oblikah bolezni ugotoviti genetske lokuse, ki se dedujejo v povezavi s to boleznijo. Na ta način je bil leta 1989 odkrit prvi genetski lokus na kromosomu 21 (ALS1), ki je povezan z dominantno družinsko obliko ALS (Siddique in sod., 1989). V tem lokusu so kasneje identificirali gen *SOD1* in številne mutacije v njem v povezavi z ALS (Rosen, 1993). Ker z genom *SOD1* mnogih primerov ALS niso mogli razložiti, so sledile številne raziskave z različnimi genetskimi pristopi za identifikacijo novih genov in mutacij, povezanih z ALS. Z boleznijo ALS je povezanih mnogo različnih genov, trenutno je v splošno dostopni bazi ALSoD (2015) opisanih že 657 mutacij v 126 genih, vendar je bila velika večina teh genov povezana z boleznijo v posameznih primerih, zato jih zaenkrat lahko uvrščamo le med kandidatne gene, za katere bo morebitno potrditev potrebno pokazati z dodatnimi študijami. Na drugi strani pa spremembe v genih *SOD1* (Rosen, 1993), *FUS* (Kwiatkowski in sod., 2009; Vance in sod., 2009), *TARDBP* (Kabashi in sod., 2008; Sreedharan in sod., 2008; Van Deerlin in sod., 2008) in *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011) predstavljajo visoko stopnjo tveganja za nastanek ALS, kar potrjujejo številne študije. Te štiri gene bomo v nadaljevanju tudi podrobneje predstavili. Drugi, redkeje udeleženi geni, med katerimi so nekatere povezali tudi z drugimi nevrodegenerativnimi boleznimi, pa so še geni *OPTN* (Maruyama in sod., 2010), *VCP* (Johnson in sod., 2010; DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Koppers in sod., 2013), *SQSTM1* (Fecto in sod., 2011), *FIG4* (Chow in sod., 2009), *ATXN2* (Elden in sod., 2010), *DAO* (Mitchell in sod., 2010), *SPG11* (Orlacchio in sod., 2010), *PFN1* (Wu in sod., 2012), *VAPB* (Nishimura in sod., 2004), *ALS2* (Yang in sod., 2001), *SETX* (Chen in sod., 2004) in *ANG* (Greenway in sod., 2006). Pri dednih oblikah je pri približno dveh tretjinah bolnikov mutacija, ki je vzrok za bolezen, odkrita; pri sporadičnih oblikah pa le pri okoli

11 % bolnikov (Andersen in Al-Chalabi, 2011; Renton in sod., 2014), kar je razvidno tudi iz slike 2. Sporadične oblike morda povzročajo mutacije z nižjimi penetrancami, *de novo* nastale mutacije, razne genske variacije in epigenetski dogodki (Tsuji, 2013). Klinično se sporadična in dedna oblika ne ločita, vendar pa se v primerjavi s sporadično dedna oblika bolezni pojavi v zgodnejši dobi življenja (Li in sod., 1988), približno desetletje pred sporadično (Wijesekera in Leigh, 2009), in traja dalj časa, ženske in moški pa zbole vajo enako pogosto (Li in sod., 1988; Strong in sod., 1991). Do 20 % vseh bolnikov z ALS ima hkrati tudi simptome frontotemporalne demence (angl. frontotemporal dementia, FTD), kjer prihaja do propadanja nevronov v frontotemporalnih regijah možganov (Liscic in sod., 2008). Zanimivo je bilo odkritje, da so lahko nekateri za ALS značilni geni odgovorni za kombinacijo ALS-FTD (Byrne in sod., 2011). Takšna sta gena *UBQLN2* (Deng in sod., 2011) in *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011). Odkritje vpletenosti slednjega je leta 2011 predstavljalo novo prelomnico v raziskovalnih odkritjih, saj spada, z ozirom na dosedanja spoznanja, med najpogostejše genetske vzroke za razvoj bolezni. Dodatno je tudi utrdilo domneve, da patogeneza ALS poteka po več različnih genetskih in molekularnih poteh (Rothstein, 2009).



**Slika 2:** Časovnica odkrivanja genov pri dedni (FALS) in sporadični (SALS) obliki ALS (levo). Odstotek znanih genov pri obeh oblikah bolezni v Evropi (desno) (Renton in sod., 2014).

**Figure 2:** Timeline of gene discoveries in familial (FALS) and sporadic (SALS) ALS (left). Values represent the proportion of ALS explained by each gene in populations of European ancestry (right) (Renton et al., 2014).

### 2.1.1 SOD1, prvi z ALS povezan gen

Identifikacija gena *SOD1* kot prvega z ALS povezanega gena je pred dobrimi dvajsetimi leti sprožila vpogled v razumevanje ALS patogeneze (Rosen, 1993). Od takrat je bilo v tem

genu najdenih več kot 170 različnih mutacij, vendar pa dokazi o njihovi patogenosti obstajajo za le nekaj od njih (Andersen, 2006). Populacijske študije kažejo, da so mutacije v tem genu vzrok za približno 20 % dednih oblik in 3 % sporadičnih primerov ALS (Colombrita in sod., 2011) in so prisotne v vseh 5-ih eksonih gena (Ticozzi in sod., 2011). Protein SOD1 je konstitutivno in ubikvitarno izražen v vseh celicah (Felbecker in sod., 2010). Gre za močno ohranjen citoplazemski protein, ki kodira Cu/Zn superoksid dismutazo (Ticozzi in sod., 2011). Mutacije v genu *SOD1* lahko povzročijo poškodbe nevronov zaradi akumulacije toksičnih produktov, kar privede do hitre celične smrti (Bocci in sod., 2011), obenem pa zmanjšana aktivnost tega encima zaradi mutacije ni vzrok za patologijo bolezni (Prudencio in sod., 2009). Fenotipska heterogenost je velika, mutacija D90A je recesivna in bolniki, ki so homozigoti za to mutacijo, so manj prizadeti, preživetje običajno preseže 10 let (Andersen in sod., 1996). Na drugi strani pa je mutacija A4V povezana z dominantno, agresivno potekajočo boleznijo, ki se konča s smrtjo že v 1 letu (Cudkowicz in sod., 1997). Kognitivna prizadetost je redka, čeprav se lahko pojavi v poznih stadijih bolezni (Turner in sod., 2005). Patologija bolezni ALS, ki jo povzročijo mutacije v genu *SOD1*, je drugačna od vseh ostalih tipov bolezni v tem, da ni prisotne TDP-43 in/ali FUS patologije (Mackenzie in sod., 2007).

### **2.1.2 Odkritje genov *TARDBP* in *FUS* kaže na vpletenost okvarjenega procesiranja RNA pri propadanju motoričnih nevronov**

Gen *TARDBP* kodira pretežno jedrni ribonukleoprotein TDP-43, ki uravnava transkripcijo, alternativno izrezovanje in stabilnost RNA (Sreedharan in sod., 2008). Pomembno vlogo ima pri miRNA procesiranju in miRNA biogenezi (Ling in sod., 2010). Izraža se v vseh celicah in se lahko veže na DNA ali RNA (Sreedharan in sod., 2008). Zmanjšanje količine proteina TDP-43 spremeni nivo več kot 600 mRNA, med njimi tudi drugih z ALS povezanih genov, kot sta *FUS* in progranulin ter številnih drugih genov, vključenih v prenos signalov, vnetne procese in celični obrambni sistem (Polymenidou in sod., 2011). Leta 2006 so ugotovili, da se protein TDP-43 pri bolnikih prenese iz jedra v citoplazmo in je glavna komponenta ubikvitiniranih proteinskih agregatov, ki nastajajo v citoplazmi propadajočih motoričnih nevronov tako pri ALS, kot tudi pri FTD (Neumann in sod., 2006). Izguba normalne jedrne funkcije, ki je povezana z metabolizmom RNA, ali pridobitev toksične funkcije, ki je povezana z motnjami stresnih zrc, agregacijo in akumulacijo v citoplazmi, sta le dva izmed možnih mehanizmov, ki lahko privedeta do bolezni (Buratti in Baralle, 2009). To so bili hkrati tudi ključni dokazi, da sta ALS in FTD, ki sta sicer dokaj različni bolezni, del kontinuiranega spektra bolezni, ne pa dve popolnoma ločeni stanji, kar je nadalje neposredno vodilo tudi k odkritju mutacij v genu *TARDBP* pri dednih oblikah ALS in tudi v družinah s FTD (Sreedharan in sod., 2008; Chio in sod., 2010). Mutacije v genu *TARDBP* so odgovorne za približno 4 % dedne oblike ALS in manjši odstotek sporadičnih primerov (Chio in sod., 2012). Večina najdenih mutacij se

nahaja v eksonu 6, ki kodira močno ohranjeno C-terminalno regijo (Rutherford in sod., 2008), vključeno v vezavo ribonukleoproteinov in izrezovanje RNA (Buratti in Baralle, 2009). Bolniki z dedno obliko bolezni in z mutacijami v genu *TARDBP* kažejo klasičen fenotip bolezni ALS, vendar se bolezen rada pojavi prej in pogostejše s simptomi v zgornjih okončinah, trajanje bolezni pa je daljše kot pri sporadični obliki ALS (Wang in sod., 2004).

Pred nekaj leti so bile kot vzrok za dedno obliko ALS odkrite še mutacije v genu *FUS* (Kwiatkowski in sod., 2009; Vance in sod., 2009). Čeprav spremembe v omenjenem genu predstavljajo vzrok le pri 4 % bolnikov z dedno obliko bolezni in manj kot 1 % pri bolnikih s sporadično obliko (Lai in sod., 2011), pa je vloga tega proteina pomembna že zato, ker ima strukturne in funkcionalne podobnosti s proteinom TDP-43. *FUS* je ubikvitarno izražen pretežno jedrni protein, ki je vpleten v popravljanje DNA, uravnavanje transkripcije, RNA izrezovanje in eksport v citoplazmo. Vloga ima tudi pri procesiranju RNA in miRNA, pri prenosu mRNA in podobno kot TDP-43, pri dinamiki stresnih zrc (Lagier-Tourenne in Cleveland, 2009). Večina bolnikov z mutacijami v genu *FUS* kaže klasičen potek bolezni brez kognitivne prizadetosti, vendar pa so klinična opažanja teh bolnikov precej različna celo med tistimi, ki imajo enako mutacijo (Yan in sod., 2010; Hara in sod., 2012). Mutacije v genu *FUS* se prav tako kot pri *TARDBP* večinoma nahajajo v C-terminalnem delu, ki kodira RNA-vezavno domeno. Mutacije preprečijo vstop proteina *FUS* v jedro ter spodbudijo tvorbo netopnih agregatov v citoplazmi prizadetih nevronov (Vance in sod., 2009). Značilna naj bi bila odsotnost agregatov ubikvitina in TDP-43 (Kwiatkowski in sod., 2009; Vance in sod., 2009), vendar pa so novejša raziskava pokazale, da je tudi *FUS* lahko kolokaliziran s TDP-43 (Deng in sod., 2010; Keller in sod., 2012). Agregacija netopnih proteinskih agregatov v citoplazmi nevronske celice in spremenjen RNA metabolizem sta očitno skupna patogene mehanizma, vpletena pri ALS in morda tudi pri drugih nevrodegenerativnih boleznih (Kwiatkowski in sod., 2009; Vance in sod., 2009; Colombrita in sod., 2011).

### 2.1.3 *C9ORF72*, prelomnica v raziskavah na področju ALS

Pri razumevanju bolezni ALS in njenih vzrokov je izrednega pomena odkritje vpletenosti gena *C9ORF72* v letu 2011. V prvem intronu gena imajo zdravi posamezniki prisotnih nekaj heksanukleotidnih ponovitev GGGGCC, medtem ko imajo bolniki z ALS lahko prisotnih več sto takšnih ponovitev (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011). Omenjena razširitev (angl. hexanucleotide repeat expansion mutation, HREM) je vzrok za bolezen pri približno 5-6 % bolnikov s sporadično obliko bolezni in pri kar 40 % bolnikov z dedno obliko, kar pomeni, da je ta mutacija najpogostejši vzrok za bolezen tako pri dednih kot tudi pri sporadičnih primerih (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Majounie in sod., 2012). Omenjena sprememba ni penetrantna pri osebah, mlajših od 35 let, kasneje pa penetranca naraste na 50 % pri 58. letih za moške in pri 63. letih za ženske. Popolna

penetrancja se kaže pri osebah, starejših od 86 let z redkimi izjemami (Williams in sod., 2013).

Večina ALS bolnikov z mutacijo v *C9ORF72* se klinično razlikuje od ostalih oblik. Pogostejši je bulbarni začetek bolezni (40 %) kot pri ostalih (25 %); kognitivne težave, predvsem frontotemporalna demenca (FTD), se pojavijo pri skoraj polovici bolnikov (pri ostalih oblikah v 10 %) (Byrne in sod., 2012; Chio in sod., 2012), lahko pa izražajo tudi parkinsonizem ali druge psihiatrične simptome, kot so psihoze in nagnjenost k samomoru (Byrne in sod., 2012; Floris in sod., 2012).

Več študij v zadnjem času poroča tudi o odkritju mutacij v več kot enem z ALS povezanim genu pri bolnikih z ALS. Ponavadi gre za ekspanzijo ponovitev v genu *C9ORF72* in še eno mutacijo v enem izmed naslednjih genov: *GRN*, *ANG*, *DAO*, *MAPT*, *TARDBP*, *OPTN*, *UBQLN2*, *VAPB*, *SOD1* ali *FUS*. Poleg mutacije v genu *ANG* pa so odkrili tudi mutacijo v genu *SOD1*, *FUS* ali *TARDBP*. Ti izsledki nakazujejo na morebitni oligogenski model razvoja bolezni ALS, po katerem so za nastanek bolezni potrebne mutacije v dveh ali več genih hkrati. Vendar obstaja tudi več drugih možnih predpostavk, namreč da ena od mutacij ni patogena, ali da je ena od mutacij primarna, druga mutacija pa le vpliva na začetek pojava bolezni, njene simptome in napredovanje, ali pa celo, da med mutacijami ni nobene medsebojne genetske interakcije (Leblond in sod., 2014). Za potrditev oligogenskega modela v povezavi z ALS bo potrebno narediti obširne študije po celotnem genomu na velikem številu bolnikov (Renton in sod., 2014).

V uporabi zdravila za bolezen zaenkrat še ni, obstaja le podporna terapija v obliki lajšanja simptomov. Študije na področju genetike naj bi pripomogle k razumevanju patogeneze bolezni ALS in obenem utirale pot do bolj natančne prognoze in zdravljenja, ali pa bi vsaj izboljšale kvaliteto življenja. Vendar pa kljub intenzivnim raziskavam bolezni ALS večina predvsem sporadičnih primerov ostaja nepojasnjena. Raziskave so se zato morale razširiti tudi na druga področja. Upanje vzbuja predvsem široko področje, ki ga zajema epigenetika, saj z napredovanjem raziskav na tem področju postaja jasno, da je pojav bolezni ALS povezan tudi s kompleksnimi spremembami na področju nekodirajočih RNA, ki imajo pomembno vlogo pri uravnavanju izražanja genov (Strong, 2010).

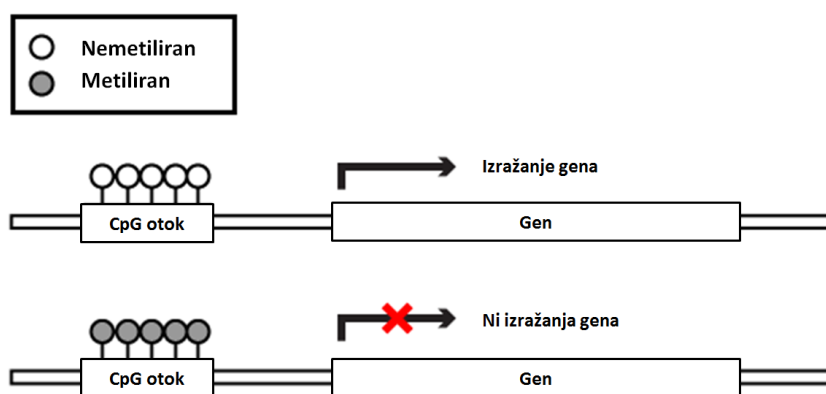
## 2.2 EPIGENETIKA

Epigenetski mehanizmi zajemajo spremembe v izražanju genov, ki so sicer lahko dedne, vendar pa genetski zapis DNA ostaja nespremenjen. Vključujejo spremenjeno biogenezo in funkcijo miRNA, metilacijo DNA, modifikacije histonov in prerazporeditve kromatina in RNA editing. Ti procesi so tekom življenja nujni, saj skupaj uravnavajo izražanje genoma in skrbijo za celično homeostazo tako, da se odzivajo na spremembe v okolju (Qureshi in Mehler, 2013; Staszewski in Prinz, 2014). Epigenetika je torej mehanizem, preko katerega okoljski dejavniki lahko vplivajo na izražanje genov. Glavna značilnost epigenoma je, da

ima vsaka celica svoj lasten epigenom, ki se s časom spreminja. Porušenje ustreznega uravnavanja epigenetskih mehanizmov je tako lahko posledica dolgotrajnega vpliva okolja, kar lahko pripomore k bolezni ALS. Predvidevajo, da lahko pride tudi do akumulacije epigenetskih vzorcev tekom življenja, kar se izrazi kot bolezen (Paez-Colasante in sod., 2015).

### 2.2.1 Regulacija uravnavanja izražanja genov preko mehanizma metilacije DNA

Metilacija DNA je pomemben epigenetski mehanizem, ki vpliva na prepisovanje DNA in tako zmanjša ali celo prepreči izražanje gena (Urduingio in sod., 2009). Sam proces metilacije poteka po transkripciji z encimom DNA-metiltransferazo, ki katalizira dodajanje metilne skupine na citozinske ostanke, kar vodi v nastanek 5-metilcitozina (5mC) (Chestnut in sod., 2011). Ta mehanizem spremeni dostopnost kromatina za transkripcijski faktor in tako vpliva na stopnjo izražanja gena (Choy in sod., 2010).

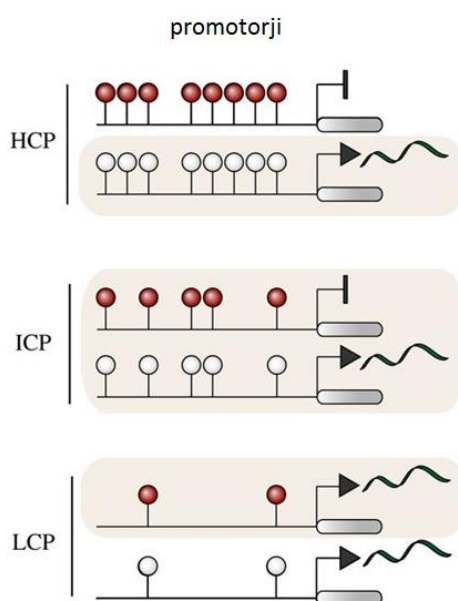


**Slika 3:** CpG otočki v promotorski regiji gena. V primeru metilacije CpG otočkov je preprečeno izražanje gena (Huang, 2007).

**Figure 3:** CpG islands in promoter region. Gene expression is repressed in case of methylated CpGs (Huang, 2007).

Metilacija DNA se ponavadi pojavlja v regulatornih regijah genoma, kot so promotorji. Tam se kot dinukleotidi citozina in gvanina (CpG) (Qureshi in Mehler, 2013) nahajajo v CpG otočkih (Urduingio in sod., 2009). CpG otočki so po definiciji regije, dolge vsaj 200 baznih parov, ki imajo razmerje dinukleotidov CpG nad 0,65 in 55 ali več odstotkov CG-jev v zaporedju (Takai in Jones, 2002). Pri človeku se pri približno 60 % genov v promotorjih nahajajo CpG otočki (Jones, 2012). Metilacija v teh regijah prepreči transkripcijo gena in tako povzroči njegovo utišanje (Qureshi in Mehler, 2013). Obenem pa metilacija CpG otočkov v promotorjih ni nujna za utišanje gena, saj je znano, da je večina CpG otočkov v promotorjih nemetilirana tudi v genih, ki se ne izražajo (Bird, 2002).

Čeprav metilacija DNA zavira izražanje genov, pa ta trditev ne velja za promotorje, ki imajo manjšo gostoto CpG dinukleotidov. Promotorje namreč glede na razmerje dinukleotidov CpG, odstotek baz GC in dolžino CpG otočkov delijo na takšne z visoko gostoto (angl. High-CpG density promoter, HCP), nizko gostoto (angl. Low-CpG density promoter, LCP) in srednjo gostoto (angl. Intermediate-CpG density promoter, ICP). HCP promotorji zadostijo zgoraj navedenim kriterijem, medtem ko med LCP promotorje spadajo tisti, ki jih definirajo kot promotorje brez CpG otočkov. V nasprotju s HCP promotorji, je večina LCP promotorjev metilirana. ICP promotorji pa zadostijo nekoliko omiljenim kriterijem in jih ne uvrščajo v nobeno izmed omenjenih skupin promotorjev (Weber in sod., 2007).



**Slika 4:** Trije tipi promotorjev glede na gostoto dinukleotidov CpG (Hackett in Surani, 2013). Metilacija DNA ni enaka v vseh področjih genoma. HCP (angl. High-CpG density promoters) promotorji ponavadi niso metilirani, medtem ko so LCP (angl. Low-CpG density promoters) promotorji pogosto metilirani. Nekje vmes se nahajajo ICP (angl. intermediate-CpG density promoter) promotorji, ki so lahko metilirani ali nemetilirani. Zasenčeno je prikazano običajno stanje promotorja. Metilacija ima signifikanten učinek na izražanje genov pri HCP in ICP promotorjih, medtem ko med metilacijo LCP promotorjev in izražanjem gena ni korelacije. Tako tudi nemetiliranost promotorja nekega gena ne pomeni nujno njegovega izražanja.

**Figure 4:** Three promoter types according to CpG density (Hackett and Surani, 2013). The distribution of DNA methylation varies according to genomic landmarks. High-CpG density promoters (HCP) are usually hypomethylated, low CpG-density promoters (LCP) are usually methylated, and intermediate CpG-density promoters (ICP) can be either methylated or unmethylated (shown as shaded). In general, methylation only has a significant transcriptional effect at HCPs and ICPs, whereas methylation at LCPs does not correlate with repression. Note also that the absence of methylation only generates a permissive state for transcription and does not necessarily result in gene activity.

Metilacija DNA je pomembna tako v procesu razvoja zarodka (Li in sod., 1992), kot za vzpostavljjanje vzorca metilacije tekom razvoja (Li in sod., 1993) in inaktivacijo X kromosoma (Heard in sod., 1997). Različne celice imajo različne vzorce metilacije, ki

omogočajo razlike v izražanju genov glede na tip celice in se tudi spreminjajo tekom življenja (Lister in sod., 2008). Med podvojevanjem DNA se vzorec metilacije prenese s staršev na potomce, vendar pa se med razvojem zarodka vzorec izbriše in kasneje vzpostavlja *de novo* (Bird, 2002). Tako se odprejo tudi možnosti za nastanek nepravilnega vzorca metilacije med razvojem ali v odrasli dobi zaradi okoljskih dejavnikov (Feinberg, 2007). Spremembe v metilaciji DNA so povezali z mnogimi boleznimi, vključno z rakom (Egger in sod., 2004) in nevrodegenerativnimi boleznimi (Lu in sod., 2013). Metilacija citozinov pa lahko povzroči tudi spontane mutacije v genomu, predvsem so pogoste spremembe C>T in G>A. Predpostavljajo, da je metilacija DNA eden od osnovnih mehanizmov staranja, saj se s časom take spremembe kopičijo ter privedejo do destabilizacije genoma in spremenjene funkcije organizma (Mazin, 2009).

Metilacija DNA je torej pomemben molekularni mehanizem za uravnavanje izražanja genov, ki bo morda lahko tudi uporaben kot epigenetski biomarker in terapijska tarča zato, ker gre za stabilen mehanizem in ga je lahko zaznavati s sodobnimi molekularnimi metodami (Paez-Colasante in sod., 2015).

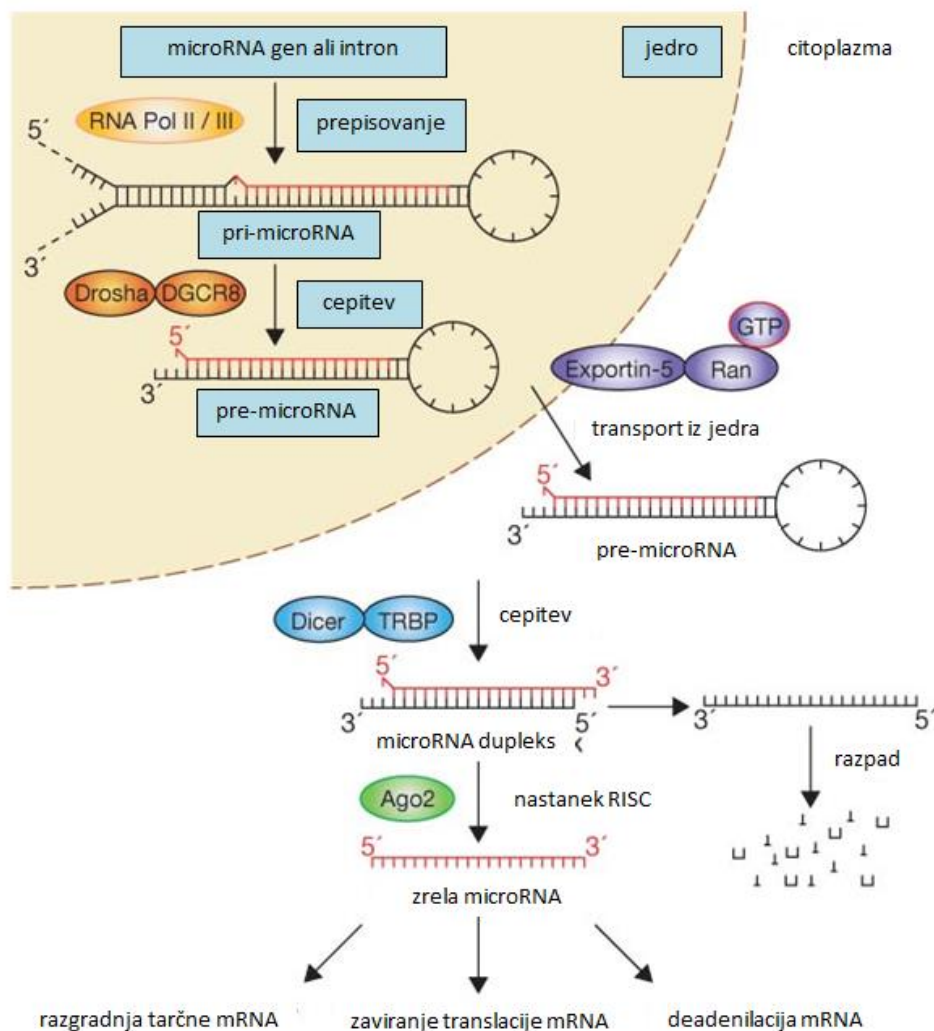
#### 2.2.1.1 Metilacija pri bolezni ALS

Pri bolnikih z ALS je bilo narejenih nekaj raziskav, ki kažejo na spremenjene vzorce metilacije DNA. Xi in sodelavci (2013) v svoji raziskavi poročajo o hipermetilaciji CpG otoka pred GGGGCC ponovitvami v prvem intronu gena *C9ORF72*. Pokazali so, da je hipermetilacija te regije povezana s pojavom razširitve heksanukleotidnih ponovitev. Višja stopnja metilacije pomeni tudi krajše preživetje bolnikov od začetka simptomov bolezni ALS. Na drugi strani pa pri bolnikih z ALS niso našli sprememb v vzorcih metilacije v genih *SOD1* in *VEGF*, ko so jih primerjali z zdravimi posamezniki (Oates in Pamphlett, 2007). V drugi raziskavi so Chestnut in sod. (2011) določali izražanje DNA-metiltransferaz, ki so nujne za normalen razvoj živčnega sistema. Pokazali so njihovo zvišano izražanje, zaradi česar pride do povečane metilacije DNA, kar lahko vodi v apoptozo motoričnih nevronov. Spremenjene vzorce metilacije v genih, ki regulirajo nivoje kalcija, eksitoksičnost, oksidativni stres, vnetje živcev, razvoj možganov, življenjsko dobo celic in apoptozo, pa so dokazali tudi v možganih in hrbtenjači bolnikov ALS po smrti (Morahan in sod., 2009; Figueroa-Romero in sod., 2012). Izsledki teh študij nakazujejo, da bi epigenetske spremembe lahko predstavljale nove biomarkerje in bi pripomogle tudi k razvoju terapij.

#### 2.2.2 Procesiranje mikroRNA in njihova vloga pri izražanju genov

Izražanje genov preko epigenetskih mehanizmov regulirajo tudi mikroRNA (miRNA). MiRNA so približno 22 nukleotidov dolge, enoverižne, nekodirajoče molekule RNA, ki

delujejo kot post-transkripcijski regulatorji izražanja genov tako, da povzročijo razgradnjo tarčne mRNA ali pa zavrejo njeno translacijo (Pillai in sod., 2007).



**Slika 5:** Pot procesiranja miRNA (Winter in sod., 2009). V procesu nastanka zrele miRNA najprej pride do prepisa z RNA polimerazo II ali III in nastanka primarne miRNA (pri-miRNA). Nato v jedru pride do cepitve s pomočjo kompleksa proteinov Drosha in DGCR5 (Pasha) in nastane prekursorska miRNA (pre-miRNA), ki se zvije v obliko lasnice in se s prenašalcem eksportinom-5 prenese v citoplazmo. Tu encim Dicer cepi pre-miRNA in nastane dupleks verig miRNA (miRNA-miRNA\*), od katerih je ena funkcionalna miRNA, ki skupaj s proteini Ago tvori kompleks RISC (angl. RNA induced silencing complex). Tako lahko vpliva na tarčno mRNA na več načinov. Lahko jo razgradi, zavira njeno translacijo ali pa sproži njeno deadenilacijo. Druga veriga dupleksa je nefunkcionalna in se razgradi (miRNA\*).

**Figure 5:** The miRNA processing pathway (Winter et al., 2009). This maturation includes the production of the primary miRNA transcript (pri-miRNA) by RNA polymerase II or III and cleavage of the pri-miRNA by the microprocessor complex Drosha–DGCR8 (Pasha) in the nucleus. The resulting precursor hairpin, the pre-miRNA, is exported from the nucleus by Exportin. In the cytoplasm, the RNase Dicer cleaves the pre-miRNA hairpin to its mature length. The functional strand of the mature miRNA is loaded together with Ago proteins into the RNA-induced silencing complex (RISC), where it guides RISC to silence target mRNAs through mRNA cleavage, translational repression or deadenylation, whereas the passenger strand is degraded.

MiRNA nastanejo po prepisu z RNA polimerazo II ali III v primarno miRNA (pri-miRNA, daljša od 1000 baznih parov), ki ima metilgvanozinsko kapo, obliko lasnice in rep poli-A (Pillai, 2005), s procesiranjem v dveh korakih (Slika 5). Najprej v jedru s pomočjo encima Drosha (RNaza III) in proteina DGCR8, ki ima vezavno domeno za dvoverižno RNA, iz pri-miRNA nastane približno 70 nukleotidov dolga prekursorska miRNA (pre-miRNA), ki se zvije v obliko lasnice in se s prenašalcem eksportinom-5 prenese v citoplazmo. Tam v drugem koraku procesiranja encim Dicer (RNaza III) cepi pre-miRNA in nastane dupleks dveh verig miRNA (miRNA-miRNA\*), od katerih se ena razgradi (miRNA\*), druga pa je zrela miRNA, ki se skupaj s proteini Ago vgradi v proteinski kompleks RISC (angl. RNA-induced silencing complex) (Pillai, 2005; Pillai in sod., 2007; Kim in sod., 2009; Kawahara in Mieda-Sato, 2012).

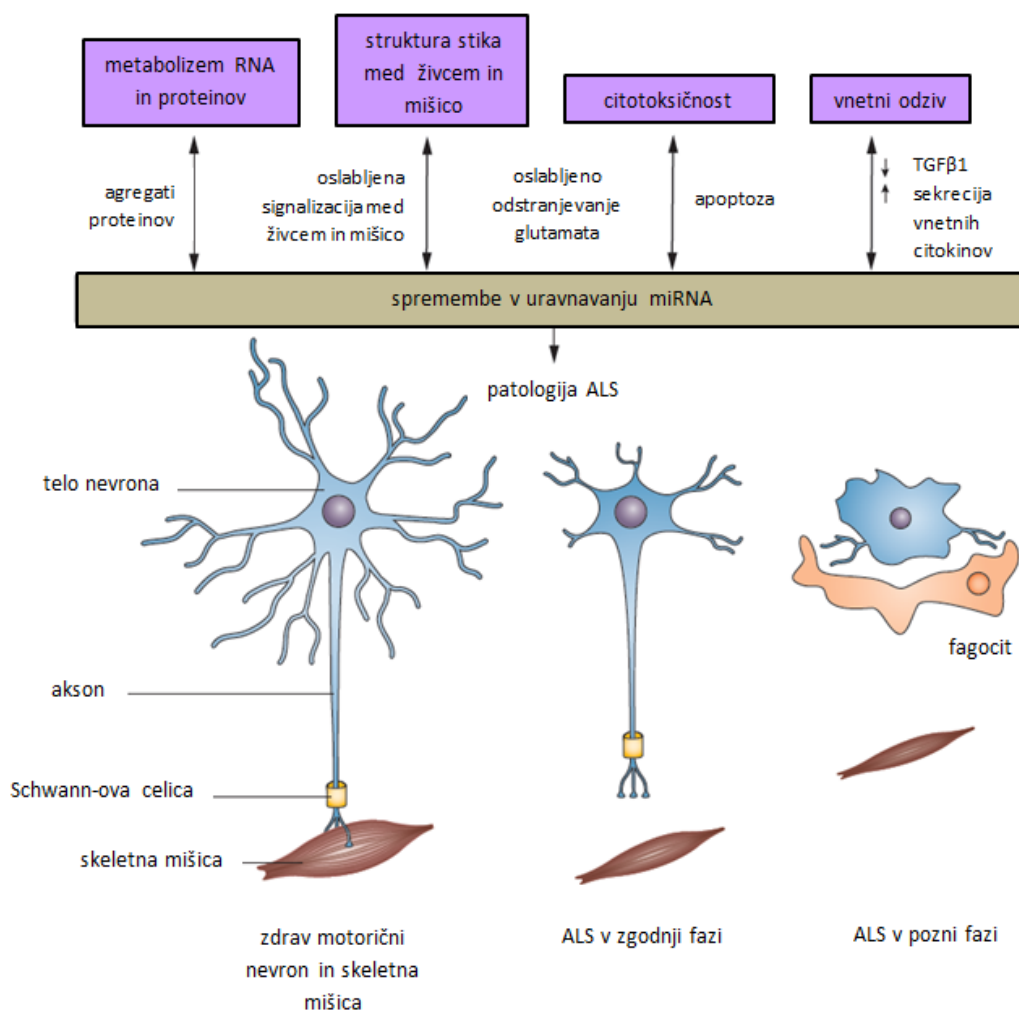
DNA zapisi za miRNA se lahko nahajajo znotraj genov v intronih (intragenske miRNA). Takšnih je približno četrtina in se navadno prepisujejo v enaki orientaciji kot njen gostiteljski gen. Lahko pa so DNA zapisi za miRNA neodvisni od protein kodirajočega gena (intergenske miRNA). Za intragenske miRNA je značilno, da imajo s svojim gostiteljskim genom skupen promotor in zato ob prepisovanju gostiteljskega gena pride tudi do prepisa miRNA in skupnega izražanja miRNA z gostiteljskim genskim zapisom (Bartel, 2004). V primarnem genskem zapisu (pre-miRNA) so kodirane v regiji, ki ne nosi zapisa za protein (intronska regija) in se iz njega odstranjujejo v procesu jedrnega izrezovanja RNA (Ying in sod., 2008).

Po oceni bioinformatičnih analiz naj bi miRNA pri človeku vplivale na izražanje kar 30 % genov (Filipowicz in sod., 2008). So dinamične in raznolike molekule, ki se lahko hitro odzivajo na okoljske spremembe, hkrati pa so zmožne vplivati na izražanje svojih tarčnih genov skozi daljše obdobje (Qureshi in sod., 2010). Izražajo se različno v določenih fazah razvoja (Pillai, 2005), uravnavajo vzorce izražanja in časovni potek razvoja ter se izražajo tkivno specifično (Bartel, 2004). Povezujejo jih s številnimi patološkimi stanji kot so rak, avtoimunske bolezni ter nevrodegenerativna obolenja (Williams, 2008; O'Connell in sod., 2010), poleg tega pa so miRNA pomembne pri mnogih celičnih in razvojnih procesih. Čeprav ni več dvoma, da so miRNA izrednega pomena pri razvoju živčnega sistema in njegovi funkcionalnosti, pa je še vedno malo znanega o specifični vlogi posamezne miRNA pri tem razvoju (Kye in Goncalves Ido, 2014). Tu je pomembna ovira izredna kompleksnost živčnega sistema, pa tudi samo področje nevroloških bolezni, ki izključuje možnost biopsij in tako omejuje raziskave.

#### 2.2.2.1 miRNA PRI ALS

V patogenezo bolezni ALS so vpletene tudi spremembe v procesiranju RNA preko različnih poti, ki vključujejo napake v transportu aksonov, pri stabilizaciji citoskeleta, podvojevanju in popraviljanju DNA, nefunkcionalnosti mitohondrijev, razgradnji proteinov

in pri odzivu na stresne dejavnike (Williams in sod., 2009; Chestnut in sod., 2011). Biologija RNA, oziroma njene regulatorne funkcije, predstavlja pomembno in hitro razvijajoče se področje raziskovanja in pot k odkrivanju molekularne patologije pri bolezni ALS (Da Cruz in Cleveland, 2011). Mnoge študije so že potrdile vpletenost miRNA v razvoju živčnega sistema (Conaco in sod., 2006; Akerblom in sod., 2012; Zhu in sod., 2013), prav tako pa imajo pomembno vlogo pri procesu regeneracije aksonov v motoričnih nevronih hrbtenjače. Tako lahko sklepajo, da so miRNA pomembne pri mnogih procesih, ki potekajo v motoričnih nevronih, kot so ustrezna diferenciacija nevrona v določen podtip, vzdrževanje njihove funkcionalnosti in tudi regeneracija po poškodbah (Kye in Goncalves Ido, 2014). Nedavno je bila objavljena študija, v kateri so preučevali profile miRNA v serumu bolnikov z dedno obliko bolezni ALS. Ugotovili so, da je profil miRNA homogen ne glede na to, v katerem genu ima bolnik prisotno mutacijo. Zaznali so kar 24 miRNA z znižanim izražanjem celo pri osebah, ki imajo mutacijo, vendar še ne kažejo simptomov bolezni. Izsledki te študije nakazujejo, da obstajajo povezave med različnimi geni, ki so mutirani v povezavi z ALS in da so ti skupni imenovalci tudi molekule miRNA (Freischmidt in sod., 2014). De Felice in sod. (2012) v svoji študiji poročajo o zvišanem izražanju miR-206 in hkratnem pojavu nevroloških simptomov pri bolnikih z mutiranim genom *SOD1*. Našli so 8 miRNA, ki odstopajo od normalnih vrednosti, 7 z znižanim izražanjem (miR-451, -1275, -328, -638, -149, -665, -583) in 1 z zvišanim izražanjem (miR-338-3p). Slednja miRNA je tudi kandidatni biomarker za nevrodegeneracijo, njeno izražanje je bilo zvišano pri analizi na mikromrežah (Shioya in sod., 2010). Izražanje mišično specifične miR-206 je bilo zvišano ob propadanju živcev v mišicah mišk, obenem pa je pomanjkanje te miRNA pospešilo napredovanje bolezni pri miškah s prisotno mutacijo v genu *SOD1*. Izsledki te študije nakazujejo, da ima očitno miR-206 vlogo tudi pri regeneraciji živčnih vlaken (Williams in sod., 2009). Zanimivi so tudi izsledki študije, v kateri so utišali gen *TARDBP* in opazovali, kakšne so spremembe v populaciji miRNA v celicah. Prišlo je do zvišanega izražanja miR-663 in znižanega izražanja let-7b. Obe miRNA se namreč direktno vežeta na *TARDBP* (Buratti in sod., 2010). V drugi študiji pa poročajo o vplivu mutacij v genu *TARDBP* na izražanje nekaterih miRNA kot so miR-132, miR-143 in miR-558, ki verjetno kot take tudi prispevajo k patologiji ALS (Kawahara in Mieda-Sato, 2012). Biogenezo specifičnih miRNA spodbuja tudi protein FUS. Med njimi so poleg ostalih zaznali tudi miR-132, miR-134 in miR-9, ki imajo že znano vlogo v delovanju sinaps in razvoja živčnega sistema (Morlando in sod., 2012).



**Slika 6:** Spremembe v biogenezi in funkciji miRNA so lahko vzrok in/ali posledica patogeneze ALS (Paez-Colasante in sod., 2015). Pojavijo se preko različnih celičnih poti. Citoplazemski agregati proteinov imajo vpliv na metabolizem miRNA-proteinov, oslabljena signalizacija med živcem in mišico vpliva na strukturo njunega stika, citotoksičnost zaradi slabšega odstranjevanja glutamata vodi v porušenje celične homeostaze, prihaja pa tudi do povečanega vnetnega odziva. Obenem pa je proces lahko tudi obraten, spremenjena aktivnost miRNA lahko sproži spremembe v celičnih poteh, ki povzročijo nevrodegeneracijo, povezano s patologijo ALS. TGFβ1 (angl. transforming growth factor β1).

**Figure 6:** Dysregulation of miRNA biogenesis and function may be a cause and/or consequence of ALS pathogenesis (Paez-Colasante et al., 2015). Impairments in miRNA biogenesis or function occur through the dysregulation of various cellular pathways. Specifically, miRNA– protein complex metabolism is possibly altered by cytoplasmic protein inclusions, transmission of wrongful cues due to disrupted signalling at the neuromuscular junction, hampering of cell homeostasis due to cytotoxicity associated with faulty glutamate clearance, and an overactive inflammatory response. Conversely, evidence also suggests that the dysregulation of key miRNAs triggers the alterations in these cellular pathways that cause the downstream effects ending in the neurodegeneration associated with ALS pathology. (TGFβ1 - transforming growth factor β1).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 BOLNIKI IN ZBIRANJE VZORCEV

V raziskavo smo vključili skupno 101 bolnika s klinično diagnosticirano boleznijo amiotrofična lateralna skleroza, ki jih vodijo na Inštitutu za klinično nevrofiziologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Med rednimi preiskavami so bolnikom vzeli vzorce periferne krvi. Del vzorca (1,5 ml) smo takoj zamrznili za nadaljnjo izolacijo DNA, iz preostale krvi pa začeli postopek izolacije RNA. Za analizo izražanja genov smo kot referenčno RNA uporabili vzorce periferne krvi sedmih zdravih odraslih oseb.

#### 3.2 IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISLIN IZ VZORCEV KRV IN PREVERJANJE KONCENTRACIJE

##### 3.2.1 Izolacija DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz levkocitov periferne krvi s pomočjo kompleta QIAamp DNA Blood Midi kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Količino izolirane DNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, ZDA) z merjenjem absorbance pri 260 nm, kvaliteto pa preverili z določanjem razmerja absorbanc pri  $A_{260}/A_{280}$  (vrednosti  $\sim 1,8$ ) in pri  $A_{260}/A_{230}$  (vrednosti v področju 1,8 - 2,2).

##### 3.2.2 Ekstrakcija RNA

S postopkom izolacije celokupne RNA smo pričeli takoj po odvzemu krvi. Gre za naplastitev suspenzije krvi in pufra PBS v razmerju 1:2 na reagent Ficoll-Paque PLUS (Life Sciences, Nemčija). Po centrifugiranju ločimo fazo z levkociti, ki jo po spiranju s pufrom PBS resuspendiramo v 1 ml reagenta TRI (Sigma-Aldrich, Nemčija). Ta zagotovi stabilizacijo RNA in jo zaščiti pred razgradnjo. Vzorce smo na tej stopnji shranili pri  $-70^{\circ}\text{C}$ . Izolacijo iz TRI reagenta (Sigma-Aldrich, Nemčija) smo nadaljevali po navodilih proizvajalca. Vzorce smo odtalili in jim dodali kloroform. Sledilo je centrifugiranje, s katerim smo dobili ločitev na tri faze (spodnja rdeča – proteini, vmesna bela – DNA in zgornja prozorna – RNA). Vodno raztopino smo prenesli v svežo tubico (preostanek smo zamrznili na  $-70^{\circ}\text{C}$ ) in postopek čiščenja RNA nadaljevali s pomočjo kompleta miRNeasy Mini kit (Qiagen, Nemčija), ki omogoča izolacijo miRNA in celokupne RNA. Sledili smo navodilom proizvajalca. Količino in kvaliteto izolirane RNA smo preverjali na spektrofotometru NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, ZDA) z merjenjem absorbance pri 260 nm in določevanjem razmerja absorbanc pri  $A_{260}/A_{280}$  (vrednosti  $\sim 2,0$ ) in pri  $A_{260}/A_{230}$  (vrednosti nad 2).

### 3.3 GENSKO PROFILIRANJE

#### 3.3.1 Vzorci in izbor genov za analizo

V študijo smo vključili vzorce 85 bolnikov. Prisotnost mutacij smo določali z genotipizacijo štirih, z ALS najpogostejše povezanih genov *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* in *C9ORF7*, pri čemer smo za prve tri omenjene gene uporabili metodo določevanja nukleotidnega zaporedja po Sangerju, za določevanje sprememb v genu *C9ORF72* pa metodo analize dolžine fragmentov s pomočjo kapilarne elektroforeze.

#### 3.3.2 Določevanje nukleotidnega zaporedja z metodo sekvenciranja po Sangerju pri genih *SOD1*, *FUS* in *TARDBP*

##### 3.3.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za izbrane kodirajoče regije genov *SOD1*, *FUS* in *TARDBP* ter njihove pripadajoče intronske regije smo uporabili ustrezne in optimizirane začetne oligonukleotide, ki so skupaj s pogoji pomnoževanja navedeni v Preglednica 1. Reakcijska zmes je bila pripravljena glede na navodila proizvajalca izbrane polimeraze, prav tako pa je navodilom sledil protokol pomnoževanja. Reakcijski volumen je pri vseh pomnožkih znašal 30 µl, pomnoževanje pa je potekalo v termičnih ciklizatorjih DNA Engine (Biorad, ZDA) in UNO II Thermoblock (Biometra, Nemčija). Uspešnost pomnoževanja smo preverili na 2 % agarozni gelski elektroforezi, produkte pa nato očistili s kompletom Diffinity Rapid Tip (Diffinity Genomics, ZDA) po navodilih proizvajalca.

**Preglednica 1:** Specifični začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo, s podatki o pogojih pomnoževanja, uporabljenima polimerazama in dolžino posameznih pomnoženih produktov. Specifični začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje genomske DNA z verižno reakcijo s polimerazo, s podatki o pogojih pomnoževanja, uporabljenima polimerazama in dolžino posameznih pomnoženih produktov. \* izbrani začetni oligonukleotid za sekvenčno reakcijo. V primeru eksona 15 v genu *FUS* smo za sekvenciranje uporabili tretji primer. Ekson 6 gena *TARDBP* smo razdelili na dva dela zaradi dolžine pomnožka.

**Table 1:** Specific primers used for PCR amplification of genomic DNA together with annealing temperatures, used polymerases and the lengths of PCR products. \*primer used for sequencing. In case of exon 15 of *FUS* gene selected primer was not used for PCR reaction. Exon 6 of *TARDBP* gene was divided in two sequences due to its length.

| Gen    | Ekson | Začetni oligonukleotid (5'- 3') F/R                         | Dolžina (bp) | Polimeraza                                                  | Tann (°C) |
|--------|-------|-------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| SOD1   | 1     | ATTGGTTTGGGGCCAGAGT<br>TGA CT CAG CACT TGGGCACCGCA*         | 408          | HotStarTaq <i>Plus</i> + Q (Qiagen, Nemčija)                | 62        |
|        | 2     | TTGCTGGAGGTTCACTGGCTAGAAA<br>G<br>AGCCTGAGCGACAGAGCAAGACCC* | 391          |                                                             |           |
|        | 3     | AGAAGTCGTGATGCAGGTCAGCA<br>GGTTTAGATGAGTCAGCAAGTTC*         | 325          | Taq DNA Rec. (Life Technologies, ZDA) + Q (Qiagen, Nemčija) |           |
|        | 4     | TTTGCAAATTTGTGTCTACTCAGTC<br>ACCGCGACTAACAATCAAAGTGA*       | 304          | Taq DNA Rec. (Life Technologies, ZDA)                       |           |
|        | 5     | AAACATCTTTTGGGTATTGTTGG*<br>TCCAAGTGATCATAAATCAGTTTC        | 357          |                                                             |           |
| FUS    | 6     | TTCTTTTGCCTTCATTGCC<br>ATGCACTAGGGACTGGCTTC*                | 434          | HotStarTaq <i>Plus</i> + Q (Qiagen, Nemčija)                | 53        |
|        | 14    | GAGCTGGGACCAAAGAATCC*<br>CCCCTGAGTTAATTTTCCTTCC             | 397          |                                                             | 54        |
|        | 15    | TACTCGCTGGGTAGGTAGG<br>CATAGCTGGGCAAATTTAGG                 | 552          | Taq DNA Rec. (Life Technologies, ZDA)                       | 61        |
|        |       | CTTGGGTGATCAGGAATT*                                         |              |                                                             |           |
| TARDBP | 6.1   | TGCTTGTAATCTAAGTTTTGTTGC*<br>GTTATTACCCGATGGGCCTG           | 430          | HotStarTaq <i>Plus</i> + Q (Qiagen, Nemčija)                | 57        |
|        | 6.2   | GGTTTGGGAAACAATCAAGG<br>TGCTGAATATACTCCACACTGAAC*           | 489          | HotStarTaq <i>Plus</i> (Qiagen, Nemčija)                    | 59        |

### 3.3.2.2 Sekvenčna reakcija in sekvenciranje

Sekvenčno reakcijo smo izvedli po naslednjem protokolu: 2 µl reagenta BigDye Terminator v1.1, redčenega v razmerju 1:2 s sekvenčnim pufrom (Life Technologies, ZDA), 1 µl specifičnega začetnega oligonukleotida (za sekvenčno reakcijo uporabljen

začetni oligonukleotid je v Preglednica 1 označen z \*), 1  $\mu$ l očiščenega produkta PCR in dH<sub>2</sub>O do končnega volumna 10  $\mu$ l. Sekvenčna reakcija je potekala po naslednjem programu: začetna denaturacija 20 sekund pri 96°C; 25 ciklov s hitrostjo temperaturnih prehodov 1°C/sekundo (denaturacija 20 sekund pri 96°C, pripenjanje začetnih oligonukleotidov 10 sekund pri 50 °C, podaljševanje verige 4 minute pri 60°C). Produkta DNA sekvenčne reakcije smo očistili z obarjanjem v etanolu po navodilih proizvajalca, ki so razvidna iz Preglednica 2. Očiščene produkte sekvenčne reakcije smo raztopili v deioniziranem formamidu (Applied Biosystems, ZDA) in jih 1 minuto denaturirali pri 95 °C, takoj zatem pa ohladili na ledu. Analizo določevanja nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem po Sangerju smo izvedli na sekvenatorju DNA ABI Prism 310 (Applied Biosystems, ZDA) v polimeru POP-6 (Applied Biosystems, ZDA).

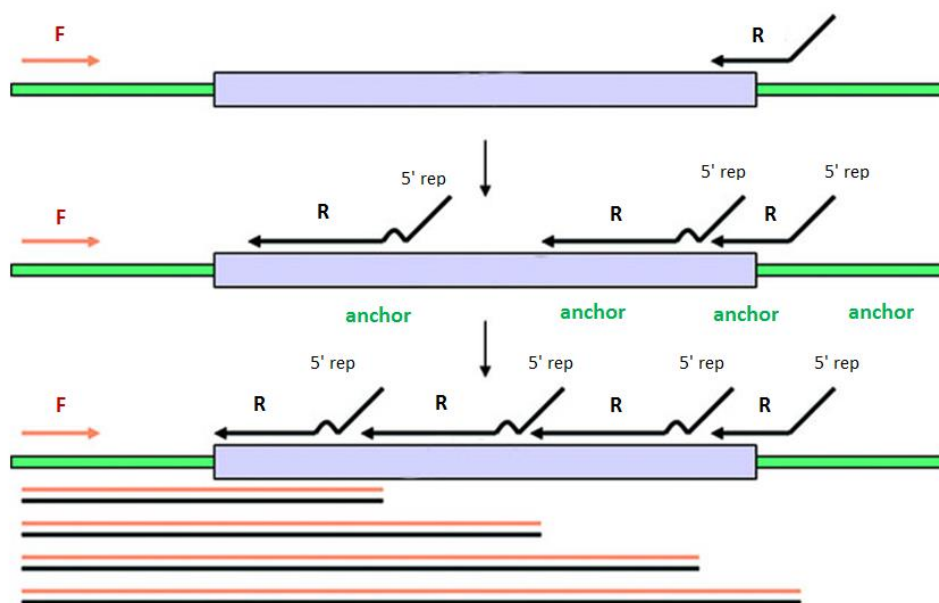
**Preglednica 2:** Protokol etanol/natrijevega acetatnega obarjanja produktov sekvenčne reakcije.

**Table 2:** Protocol for cleaning products of sequencing reaction with ethanol/sodium solution.

|    |                                                                                                                                 |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Vzorcu dodamo 1 $\mu$ l 125 mM EDTA (Sigma, ZDA).                                                                               |
| 2  | V epruveti zmešamo 1 $\mu$ l 3M natrijevega acetata (Riedel-de Haën, Nemčija) in 25 $\mu$ l 100-odstotnega etanola (Merck, ZDA) |
| 3  | 26 $\mu$ l mešanice dodamo vzorcu                                                                                               |
| 4  | Premešamo z vibracijskim mešalnikom                                                                                             |
| 5  | Inkubiramo 15 min pri sobni temperaturi                                                                                         |
| 6  | Centrifugiramo 30 min pri 3000 x g (pri 4 °C)                                                                                   |
| 7  | Odstranimo supernatant s centrifugiranjem pri 185 x g in takoj dodamo 35 $\mu$ l 70-odstotnega etanola                          |
| 8  | Premešamo z vibracijskim mešalnikom                                                                                             |
| 9  | Centrifugiramo 15 min pri 1650 x g (pri 4 °C)                                                                                   |
| 10 | Odstranimo supernatant s centrifugiranjem pri 185 x g                                                                           |
| 11 | Do uporabe shranimo pri –20 °C ali pa vzorcu dodamo formamid (Sigma, ZDA) za analizo s sekvenatorjem                            |

### 3.3.3 Gen *C9ORF72*; kapilarna elektroforeza in analiza dolžine fragmentov s pomočjo programa GeneScan

Za zaznavanje povečanja števila heksanukleotidnih ponovitev (angl. hexanucleotide repeat expansion mutation, HREM) v 1. intronu gena *C9ORF72* smo uporabili specifični dvostopenjski protokol (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011), kjer smo v prvi stopnji izvedli klasično verižno reakcijo s polimerazo, v drugi stopnji pa sledili kompleksnejšemu protokolu RP-PCR (angl. repeat-primed PCR), ki omogoča pomnoževanje DNA zaporedja tudi v prisotnosti večjega števila ponovitev zaporedja šestih nukleotidov (GGGGCC).



**Slika 7:** Princip pomnoževanja razširitev heksanukleotidnih ponovitev v genu *C9ORF72* z metodo RP-PCR (prirejeno po (Hantash in sod., 2010)). Pomnoževanje poteka s tremi oligonukleotidnimi začetniki. F (angl. forward) oligonukleotid nalega na regijo pred začetkom razširitev v genu *C9ORF72*. R (angl. reverse) oligonukleotid nalega na komplementarno verigo DNA tako, da se s 5-8-imi nukleotidi ujema s heksanukleotidnimi ponovitvami, ostali nukleotidi pa predstavljajo 5' rep, kamor nalega drugi R oligonukleotid (anchor oligonukleotid). Tak način pomnoževanja preprečuje skrajševanje produktov pomnoževanja. Rezultat so fragmenti, ki se razlikujejo v dolžini za 6 nukleotidov in jih lahko ločimo s kapilarno elektroforezo.

**Figure 7:** Principle of RP-PCR method for hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* amplification (adapted from (Hantash et al., 2010)). Three primers instead of two are used. Forward primer (F) is designed in a locus-specific region upstream of the unstable repeat of interest. The companion reverse primer (R) on the complementary strand consists of 5 to 8 units of the repeat and a 5' tail that is used as an anchor for the second reverse primer (anchor primer), which prevents progressive shortening of the PCR products during subsequent cycles. Products of PCR amplification vary in their length by 6 nucleotides and can be visualized using capillary electrophoresis.

### 3.3.3.1 Reakcije verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR)

V prvi stopnji smo za pomnoževanje uporabili 2 začetna oligonukleotida (Preglednica 3), ki pokrivata regijo morebitnih ponovitev v 1. intronu gena *C9ORF72*. Reakcijo smo izvedli s kompletom FastStart PCR Master (Roche, Nemčija) po navodilih proizvajalca v končnem volumnu 30  $\mu$ l. Sledili smo specifičnemu protokolu pomnoževanja, ki je prikazan v Preglednica 4 in je potekal na termičnem ciklizatorju DNA Engine (Biorad, ZDA). Uspešnost pomnoževanja smo preverili na 2 % agaroznem gelu.

V drugi stopnji smo nadaljevali z analizo vzorcev, pri katerih je v prvi stopnji prišlo do pomnoževanja le enega alela, drugi alel pa na agaroznem gelu ni viden morda zaradi večih ponovitev šestih nukleotidov v zaporedju, ki jih z običajno reakcijo PCR ni možno pomnožiti. Pomnoževanje s tremi primerji RP-PCR smo prav tako izvedli s kompletom

FastStart PCR Master (Roche, Nemčija) v končnem volumnu 15  $\mu$ l. V reakcijsko zmes smo dodali 1  $\mu$ l mešanice treh začetnih oligonukleotidov (Preglednica 3), 1  $\mu$ l 100 % reagenta DMSO (Life Technologies, ZDA), 3  $\mu$ l reagenta Q (Qiagen, Nemčija), 0,5  $\mu$ l reagenta 7-deaza dGTP (New England Biolabs, Velika Britanija), 0,5  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$  (Qiagen, Nemčija), 50 ng DNA in  $dH_2O$  do končnega reakcijskega volumna 15  $\mu$ l. Pomnoževanje je potekalo po istem protokolu (Preglednica 4) kot v prvi stopnji, uspešnost pomnoževanja pa smo prav tako preverili na agaroznem gelu.

**Preglednica 3:** Specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje heksanukleotidnih razširitev v intronu gena *C9ORF72* z verižno reakcijo s polimerazo (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011).

**Table 3:** Specific primers for PCR amplification of hexanucleotide repeat expansion of *C9ORF72* gene (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

| PCR                      | Začetni oligonukleotid (5'- 3')             | Dolžina PCR produkta (bp)                         |
|--------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| C9ORF72-F                | CAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC                     | 138                                               |
| C9ORF72-R                | GCAGGCACCGCAACCGCAG                         |                                                   |
| <b>Repeat-primed PCR</b> |                                             | <b>Končna koncentracija v reakcijski mešanici</b> |
| RP-PCR-F                 | <b>6-FAM</b> -AGTCGCTAGAGGCGAAAGC           | 20 $\mu$ M                                        |
| RP-PCR-R                 | TACGCATCCCAGTTTGAGACGGGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGG | 10 $\mu$ M                                        |
| RP-PCR-anchor            | TACGCATCCCAGTTTGAGACG                       | 20 $\mu$ M                                        |

**Preglednica 4:** Protokol pomnoževanja gena *C9ORF72* po metodi RP-PCR (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011).

**Table 4:** Protocol of *C9ORF72* PCR amplification using RP-PCR method (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

| T     | čas    | Št. ciklov |
|-------|--------|------------|
| 95 °C | 15 min |            |
| 94 °C | 1 min  | x2         |
| 70 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x3         |
| 68 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x4         |
| 66 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x5         |
| 64 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x6         |
| 62 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x7         |
| 60 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x8         |
| 58 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 94 °C | 1 min  | x5         |
| 56 °C | 1 min  |            |
| 72 °C | 3 min  |            |
| 72 °C | 10 min |            |
| 4 °C  | ∞      |            |

### 3.3.3.2 Kapilarna elektroforeza, analiza

Uspešno pomnoženim produktom PCR smo dodali 0,6 µl standarda LIZ in 19,4 µl deioniziranega formamida (Applied Biosystems, ZDA). Tako pripravljene vzorce smo denaturirali 3 minute pri 95 °C in jih nato ohladili na ledu. Analiza je potekala pri standardnih pogojih v polimeru POP-4 (Applied Biosystems, ZDA) na aparaturi DNA ABI

Prism 310 (Applied Biosystems), rezultate pa smo analizirali s pomočjo programske opreme GeneScan 3.7 (Applied Biosystems, ZDA).

### 3.3.3.3 Bioinformatika

Dobljena nukleotidna zaporedja smo ovrednotili s pomočjo spletnega orodja Ensembl (Cunningham, 2015). Za določevanje potencialnih novih genetskih sprememb smo uporabili spletne baze ALSoD (2015), dbSNP (2015), Exome Variant Server (2015) in bazo podatkov 1000 Genomes (1000 Genomes Project Consortium, 2012). Za ocenitev vpliva novih sprememb v genomu na funkcionalnost proteina smo uporabili dve *in silico* predikcijski orodji, in sicer program ESEfinder 3.0 (Smith in sod., 2006) in NetGene2 (Knudsen, 1991; Hebsgaard in sod., 1996).

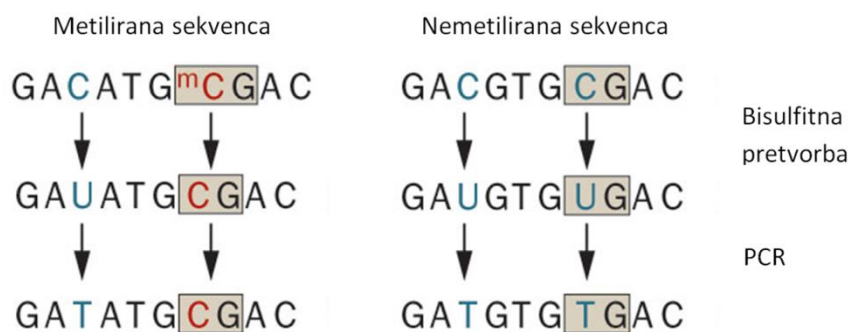
## 3.4 ANALIZA METILACIJSKEGA STATUSA

### 3.4.1 Vzorci

Za raziskave na področju določevanja metilacijskega statusa promotorjev smo imeli na voljo 95 vzorcev bolnikov in 50 zdravih odraslih posameznikov s povprečno starostjo 48 let, katerih vzorce smo zmešali in jih uporabili kot kontrolo. Začetni material je bila izolirana DNA ustrezne kvalitete in količine, ki jo je bilo najprej potrebno bisulfitno pretvoriti. Na štirih vzorcih je bilo izvedeno metilacijsko profiliranje celotnega genoma, podatke pa smo potem validirali z metodo metilacijsko-specifične analize talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti (angl. Methyl-Specific High Resolution Melt, MS-HRM). Rezultate smo dodatno potrdili z metodo sekvenciranja po Sangerju.

### 3.4.2 Bisulfitna pretvorba in čiščenje produkta

V namene analize metilacijskega statusa genov smo del izolirane DNA obdelali z natrijevim bisulfitom. Ob prisotnosti bisulfitu se nemetilirani citozini hidrolitično deaminirajo v uracile, metilirani citozini pa ostanejo nespremenjeni. Razliko v DNA zaporedju med metilirano in nemetilirano DNA zaznamo po kasnejših reakcijah PCR, ko se na mesta uracilov vključujejo timini (Slika 8).



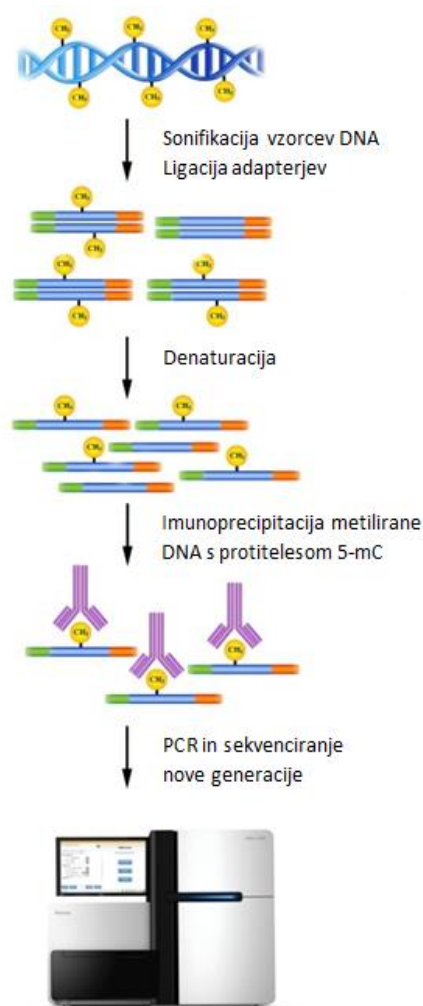
**Slika 8:** Postopek deaminacije citozinov med bisulfitno pretvorbo DNA in PCR reakcija po obdelavi z bisulfitom.

**Figure 8:** Cytosine deamination during bisulfite conversion and PCR amplification after bisulfite treatment.

Bisulfitno pretvorbo smo izvedli s komercialnim kompletom EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Za reakcijsko mešanico smo uporabili 500 ng DNA in v navodilih navedeni protokol izvedli na termičnem ciklizatorju DNA Engine (Biorad, ZDA).

### 3.4.3 Metilacijsko profiliranje celotnega genoma in izbor genov za validacijo

Vzorci DNA štirih bolnikov z amiotrofično lateralno sklerozo ustrezne kvalitete in koncentracije smo poslali v podjetje Arraystar Inc. v ZDA, kje so izvedli metilacijsko profiliranje celotnega genoma na čipu HiSeq 2000 (Illumina, ZDA). Dva od izbranih vzorcev za metilacijsko profiliranje sta vsebovala mutacijo HREM, dva pa sta bila vzorca brez odkrite mutacije. Poslane vzorce DNA so razcepili na fragmente, dolge od 200 do 900 bp. Približno 1 µg fragmentirane DNA so pripravili za analizo na omenjenem čipu. Najprej je poteklo popraviljanje koncev DNA s polimerazama T4 in Klenow DNA polimerazo, sledila je ligacija genomske adapterjeve na fragmente DNA in bogatenje metilirane DNA s protitelesi anti-5-metilcitozin. Nato so izvedli reakcijo PCR pomnoževanja fragmentov in po nanosu na gel produkte velikosti od 300 do 1000 bp ekstrahirali in očistili. Dobljene knjižnice so kvantificirali na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, ZDA) in jih nato denaturirali z 0,1 M NaOH. Na ta način so dobili enovijačne DNA molekule, ki se ujamejo na pretočno celico in pomnožijo in situ. Knjižnice so nato sekvencirali na aparatu HiSeq 2000 (Illumina, ZDA) in sledili protokolu TruSeq SBS Kit 5. Analiza dobljenih podatkov je potekala s pomočjo programa Off-Line Basecaller 1.8, zaporedja, ki so uspešno prešla filter kakovosti Solexa Chastity, pa so bila poravnana s programom Bowtie 2.1.0 (Slika 9).



**Slika 9:** Postopek metilacijskega profiliranja celotnega genoma na čipu HiSeq 2000 (Illumina, ZDA)  
**Figure 9:** Whole genome methylation profiling on HiSeq 2000 chip (Illumina, USA).

Na podlagi dobljenih rezultatov 200 najbolj metiliranih promotorjev genov pri vsakem vzorcu in za vsak tip promotorja (HCP, LCP, ICP) smo za validacijo izbrali 14 genov, ki so navedeni v Preglednica 5. Kriterij za izbiro je bila funkcija oziroma vloga gena, morebitna vpletenost v procese nevrodegeneracije in podatki iz že objavljene literature. Te podatke smo pridobili s spletnih mest PubMed (2015), HGNC (2015), OMIM (2015) in Gene Cards (2015).

#### 3.4.4 Validacija hipermetiliranih odsekov z metodo MS-HRM

Za določanje prisotnosti metiliranih citozinov smo uporabili metodo metilacijsko specifične analize talilne krivulje pri visoki ločljivosti (angl. Methyl-Specific High

Resolution Melt, MS-HRM). Princip ločevanja temelji na različnih talilnih temperaturah DNA glede na zaporedje nukleotidov. Povezave med adeninom in timinom se prekinejo pri nižji temperaturi kot povezave med gvaninom in citozinom.

#### 3.4.4.1 Izbira oligonukleotidnih začetnikov

Promotorske regije izbranih genov smo pridobili s spletnega mesta Ensembl (Cunningham, 2015). Za izbiro ustreznih oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili na spletu prosto dostopen program MethylPrimer Express (Applied Biosystems, ZDA), ki najprej zazna število in velikost CpG otočkov, v drugi stopnji pa prikaže možne oligonukleotidne začetnike za izbrani CpG otoček. Oligonukleotidne začetnike smo izbrali na način, da isti par hkrati pomnožuje tako metiliran kot nemetiliran preiskovani odsek DNA. Prikazani so v Preglednica 5, skupaj s temperaturami prileganja, ki smo jih določili s postopkom optimizacije.

**Preglednica 5:** Izbrani geni in specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni za pomnoževanje bisulfitno pretvorjene DNA z verižno reakcijo s polimerazo, s pogoji pomnoževanja in dolžino pomnoženega produkta.  
\* začetni oligonukleotid za sekvenčno reakcijo.

**Table 5:** Selected genes and specific primers for PCR amplification of bisulfite converted DNA together with reaction conditions and PCR product length. \* primer used for sequencing.

| Gen            | Začetni oligonukleotid (5'- 3') F/R                 | Dolžina PCR produkta (bp) | Tann (°C) |
|----------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|-----------|
| <i>DUX4</i>    | TTTGGTTTTTTAYGTGGAAAT*<br>TCTTAAATATACCAACCCTCTCTC  | 121                       | 54        |
| <i>FRG1</i>    | GTTTTAGTAGGAGGYGGTTT*<br>CTCAAAAAACCCCTAAAAATTC     | 115                       | 52        |
| <i>PTK6</i>    | GAGTGTGTTGAGTGTTTATAAGTTGG*<br>CAAATCCTCAAACCCACTAA | 162                       | 54        |
| <i>AGAP2</i>   | TATTGGGTAGTGAGATGAGTATGG*<br>CCCATACCCAACTAACTCCTA  | 130                       | 54        |
| <i>KCNJ14</i>  | AGGGGTTTATTTAGGTTTGTTG*<br>CACTAAATCAAAACCAACCTTC   | 105                       | 56        |
| <i>TFDP1</i>   | TAGAGGYGYGTATAAATATAGT*<br>TTCTACTACTCCTCRATCTCC    | 193                       | 50        |
| <i>NRTN</i>    | GGGGTTTTTGTATTGGTTG*<br>TCCCTCAAAAAACCATTAAC        | 195                       | 55        |
| <i>NTF3</i>    | TTTAYGGGATTTAGAGTTGAAGT*<br>CACTACCCAACAAAAAAAAAAAA | 133                       | 53        |
| <i>TP73</i>    | GTTTTGGGTGATTTTTGGA*<br>AACTTACCACCCACTTCTCCTA      | 132                       | 54        |
| <i>PRKCZ</i>   | GTTTGGGTTTTAGTGGATGTAG*<br>CTTCATTTCTAAAACCACAACC   | 175                       | 54        |
| <i>KIR2DS4</i> | TAGGTATTTTATGTTTGGGAGG*<br>TTTTCTACCTTACATAAAACCCA  | 153                       | 53        |
| <i>PYCRL</i>   | TTTTTTTAGTTAATGGGTAGTGAGGG*<br>AATCTAAACCCCAACCC    | 197                       | 57        |
| <i>TERT</i>    | TGGTTTTTATTGTTGGGTTG*<br>ATAAAACCAACATCTAATCACATCC  | 128                       | 53        |
| <i>MAB21L2</i> | TTAAGTGTAGTGGTGGTTGTTA*<br>TAATCCCAAAACCATCATAA     | 132                       | 53        |

#### 3.4.4.2 Metilacijsko-specifična analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti

Metilacijsko specifično analizo talilne krivulje pri visoki ločljivosti (angl. Methyl-specific High Resolution Melt, MS-HRM) smo izvajali na aparatu Rotor Gene Q (Qiagen,

Nemčija). Za pomnoževanje smo uporabljali EpiTect HRM PCR Kit (Qiagen, Nemčija) in reakcije pripravili po navodilih proizvajalca. V 10  $\mu$ l reakcijo smo dodali 10 ng bisulfitno pretvorjene DNA in začetne oligonuklotide v končni koncentraciji 2  $\mu$ M. V vsak eksperiment smo vključili tudi bisulfitno pretvorjeno 100 % metilirano in 100 % nemetilirano DNA (EpiTect Control DNA methylated in EpiTect Control DNA unmethylated (Qiagen, Nemčija) ter mešanico vzorcev zdravih odraslih oseb (t.i. pool). Pogoji pomnoževanja so bili izbrani glede na priporočila proizvajalca; začetni denaturaciji pri 95°C 5 minut je sledilo 40 ciklov denaturacije pri 95°C 10 sekund, naleganja pri ustrezni temperaturi (Preglednica 5) 30 sekund in podaljševanja pri 72°C 10 sekund. Sledila je analiza HRM. Dvigovanje temperature je potekalo z zviševanjem za 0,1°C v 2 - sekundnih intervalih od 65 - 95°C. Odčitavanje fluorescence je potekalo med fazo podaljševanja PCR reakcije in med analizo HRM na kanalu HRM.

#### 3.4.4.3 Analiza rezultatov MS-HRM in potrjevanje z metodo sekvenciranja po Sangerju

Analizo rezultatov HRM smo izvedli s pomočjo programske opreme Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 (Qiagen, Nemčija). Rezultati analize so bili na nekaj vzorcih potrjeni z določanjem nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem po Sangerjevi metodi na sekvenatorju DNA ABI Prism 310 (Applied Biosystems, ZDA). Postopek sekvenciranja je že opisan v poglavju 3.3.2. Za analizo uporabljeni začetni oligonukleotidi so v Preglednica 5 označeni z \*.

### 3.5 ANALIZA IZRAŽANJA miRNA IN NJIHOVIH GOSTITELJSKIH GENOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU (qPCR) TER ANALIZA METILIRANOSTI PROMOTORJEV miRNA ALI GOSTITELJSKIH GENOV

Z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. real-time PCR, qPCR) smo preverili izražanje izbranih miRNA. RNA smo izolirali na način, ki je opisan v poglavju 3.2.2, sledilo je obratno prepisovanje v komplementarno DNA (cDNA). To cDNA smo kot vzorec uporabili pri reakciji qPCR, pri kateri smo uporabili za miRNA specifične oligonukleotide (navajamo jih v Preglednica 6). Izražanje posameznih miRNA v vzorcih bolnikov smo primerjali z zdravimi osebami (t.i. referenčna RNA) in tako določili izražanje posamezne miRNA glede na referenčne vrednosti. MiRNA, ki so kazale znižano izražanje, so bile zanimive za nadaljnjo analizo. S spletnih baz podatkov miRIAD (<http://www.bioinfo.mochsl.org.br/miriad>) in miRBase (<http://www.mirbase.org/>) smo pridobili podatke o lokaciji miRNA (intergenske, intragenske). Intragenskim miRNA smo z omenjenima orodjema določili gostiteljski gen in z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (qPCR) preverili izražanje le-tega. V primeru znižanega

izražanja gostiteljskega gena smo nadalje preverili, če je morda vzrok metiliranost promotorja, kar smo preverili z metodo MS-HRM. Pri intergenskih miRNA pa smo prav tako z metodo MS-HRM direktno preverjali metiliranost promotorja miRNA, v kolikor so bili v promotorju prisotni CpG otočki.

### 3.5.1 Vzorci in izbrane miRNA

V analizo izražanja miRNA smo vključili 84 bolnikov z amiotrofično lateralno sklerozo. Za analizo smo izbrali naslednjih 10 miRNA: let-7b, miR-9, miR-124a, miR-132, miR-143, miR-206, miR-338, miR-451a, miR-638 in miR-663a.

### 3.5.2 Reakcija obratnega prepisovanja

Za obratno prepisovanje smo uporabili komplet miScript II Reverse Transcription Kit (Qiagen, Nemčija). V reakcijo smo dodali 100 ng RNA, 2 µl reagenta 5x miScript HiFlex buffer (omogoča prepis tako miRNA kot mRNA), 1 µl reagenta 10x miScript Nucleics Mix, 1 µl reagenta miScript Reverse Transcriptase Mix, 0,33 µl reagenta Inhibitor RNase in vodo do končnega volumna 10 µl. Reakcija je potekala na termičnem ciklizatorju DNA Engine (Biorad, ZDA) po priporočilih proizvajalca, in sicer 60 minut pri 37 °C in 5 minut pri 95 °C. Dobljeno cDNA smo shranili pri – 20 °C.

### 3.5.3 Določevanje izražanja miRNA s kvantitativnim PCR (qPCR) v realnem času in statistična analiza rezultatov

#### 3.5.3.1 Reakcije qPCR

Reakcije qPCR smo izvedli z uporabo kompleta miScript Sybr Green PCR Kit (Qiagen, Nemčija). Vse reakcije so potekale v volumnu 10 µl na aparatu Rotor Gene Q (Qiagen, Nemčija). Glede na rezultate umeritvenih krivulj (reakcije so potekale v treh ponovitvah) smo vzorce cDNA redčili v volumskem razmerju 1:100 in za vsako reakcijo uporabili 3 µl (0,3 ng cDNA na reakcijo). V reakcijo smo dodali 5 µl reagenta 2x QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix, 1 µl univerzalnega začetnega oligonukleotida (10x miScript Universal Primer) in 1 µl začetnega oligonukleotida, specifičnega za izbrano miRNA (10x miScript Primer Assay). Reakcije qPCR so potekale v dveh ponovitvah. Kot referenčne gene smo izbrali gene *RNU6B*, *SCARNA17* in *SNORA73A*. Gen *RNU6B* smo uporabili tudi kot kontrolo ponovljivosti med različnimi serijami (angl. inter-run calibrator). Program pomnoževanja je sledil priporočilom proizvajalca. Začetni denaturaciji pri 95 °C 15 minut je sledilo 40 ciklov; denaturacija pri 94 °C 15 sekund, naleganje začetnih oligonukleotidov pri 55 °C 30 sekund in podaljševanje verige pri 70 °C 30 sekund. Sledila je analiza talilnih

krivulj produktov PCR za namen preverjanja specifičnosti in identiteto pomnoženih miRNA. Dvigovanje temperature je potekalo od 65 – 95 °C z zviševanjem za 0,1 °C v 2 – sekundnih intervalih. Odčitavanje fluorescence se je izvajalo med fazo podaljševanja reakcije PCR in med analizo talilnih krivulj na kanalu Green.

**Preglednica 6:** MiRNA in njihovi specifični začetni oligonukleotidi, uporabljeni za qPCR

**Table 6:** MiRNAs and their specific primers used for qPCR

| <i>Gen</i> | <i>Začetni oligonukleotid (5'- 3')</i> |
|------------|----------------------------------------|
| let-7b     | UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU                 |
| miR-9      | UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA                |
| miR-124a   | UAAGGCACGCGGUGAAUGCC                   |
| miR-132    | UACAGUCUACAGCCAUGGUCG                  |
| miR-143    | UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC                  |
| miR-206    | UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG                 |
| miR-338    | UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG                 |
| miR-451a   | AAACCGUUACCAUUACUGAGUU                 |
| miR-638    | AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU              |
| miR-663a   | AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC                 |

### 3.5.3.2 Statistična analiza rezultatov

Podatke smo analizirali z metodo relativne kvantifikacije (Latham, 2010), pri kateri gre za primerjavo izražanja preučevane miRNA glede na izbrane referenčne gene. Za izračun smo uporabili prazne cikle ( $C_t$ ) posameznih miRNA in referenčnih genov. Pri tej metodi najprej upoštevamo učinkovitost pomnoževanja; vrednosti preračunamo na 100 %-no učinkovitost pomnoževanja. Sledil je izračun  $\Delta C_t$ , ki je temeljil na razliki v praznih ciklih med miRNA in referenčnimi geni, pri čemer smo kot vrednost  $C_t$  referenčnih genov upoštevali geometrijsko povprečje vseh treh analiziranih genov (*RNU6B*, *SCARNA17* in *SNORA73A*).

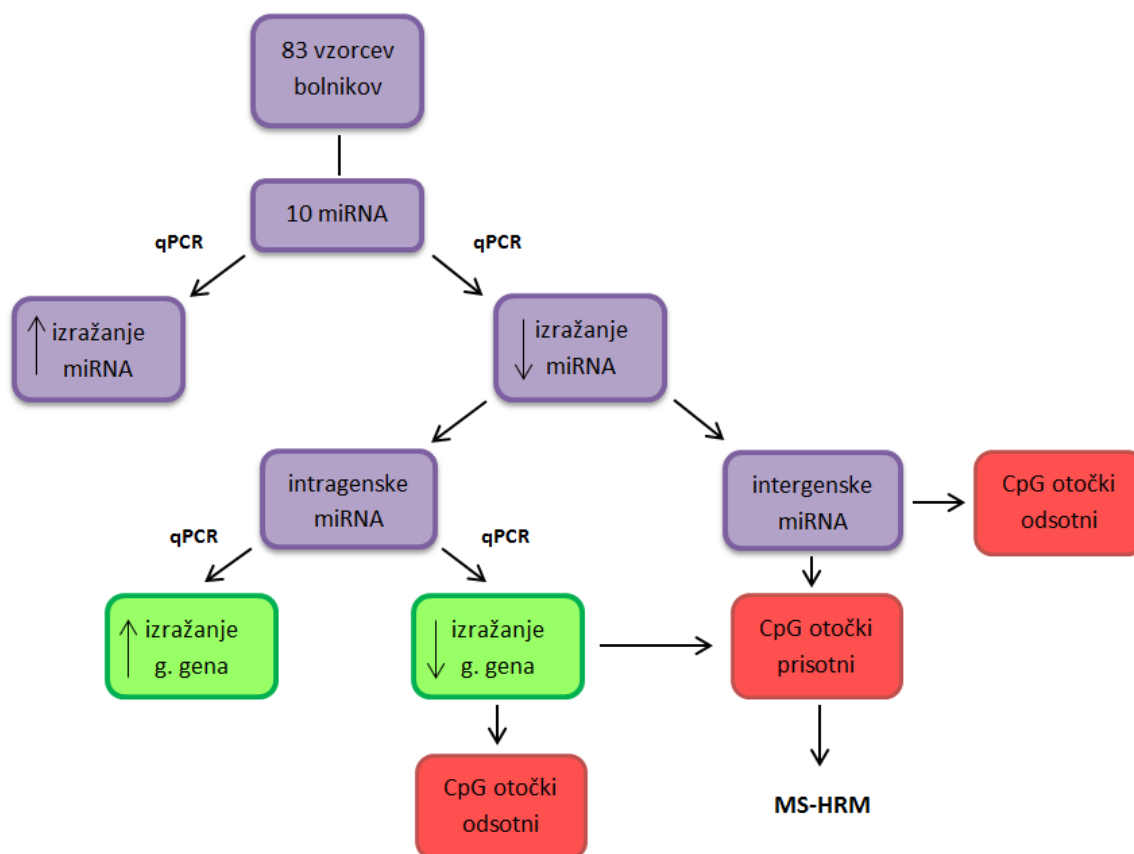
$$\Delta C_t = C_{t_{\text{preučevana miRNA}}} - C_{t_{\text{geomean referenčnih genov}}} \quad \dots(1)$$

Za izračun večkratnika sprememb izražanja miRNA smo odšteli povprečni  $\Delta C_t$  referenčne RNA od  $\Delta C_t$  vzorca ALS in to razliko ( $\Delta \Delta C_t$ ) z eksponentno funkcijo  $2^n$  pretvorili v večkratnik sprememb ( $x$ ).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{vzorec\ ALS} - \Delta Ct_{referenčna\ RNA} \quad \dots(2)$$

$$x = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \dots(3)$$

Vrednosti  $\Delta\Delta Ct$  smo uporabili za statistično analizo s programsko opremo SPSS ver. 20 (SPSS Inc., ZDA). Primerjali smo izražanje miRNA glede na spol bolnikov, prisotnost mutacije in glede na obliko bolezni (spinalna ali bulbarna). Uporabili smo parametrično metodo t-test. Če je bila vrednost  $p < 0.05$ , smo spremembe v izražanju miRNA pri preučevanih bolnikih v primerjavi z zdravimi (referenčna RNA) opredelili kot statistično značilne.



**Slika 10:** Shematski prikaz analize izražanja miRNA (vijolična področja) s qPCR in nadaljnje analize izražanja gostiteljskih genov (zeleno področje) ter analiza metiliranosti promotorjev (rdeča področja) miRNA ali gostiteljskih genov z metodo MS-HRM. g. gen – gostiteljski gen miRNA.

**Figure 10:** A schematic illustration of miRNA (purple area) expression performed by qPCR, further analysis of host gene (green area) expression and determination of promoter miRNA or host gene methylation status (red area) by MS-HRM. g. gene – miRNA host gene.

### 3.5.4 Določevanje izražanja gostiteljskih genov intragenskih miRNA

Za določevanje izražanja gostiteljskih genov *C1orf61* (miR-9), *AATK* (miR-338) in *DNM2* (miR-638) smo uporabili metodo qPCR. Vse reakcije so potekale v volumnu 10 µl na aparatu Rotor Gene Q (Qiagen, Nemčija). Glede na rezultate umeritvenih krivulj (reakcije so potekale v treh ponovitvah) smo vzorce cDNA redčili v volumskem razmerju 1:100 in za vsako reakcijo uporabili 3 µl (0,3 ng cDNA na reakcijo). V reakcijo smo dodali 5 µl reagenta 2x Sybr Select Master Mix (Life Technologies, ZDA), 1 µl začetnih oligonukleotidov 10x QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Nemčija), specifičnih za tarčni gen in 1 µl vode brez RNaz. Kot referenčna gena smo uporabili *GAPDH* in *U6*, pri čemer smo *GAPDH* uporabili tudi kot kontrolo ponovljivosti na isti način kot *RNU6B* (specifični začetni oligonukleotidi so navedeni v Preglednica 7). Reakcije so potekale v dveh ponovitvah po priporočilih proizvajalca. Najprej je potekla inkubacija pri 50 °C 2 minuti, nato začetna denaturacija pri 95 °C 2 minuti. Tema dvema korakoma je sledilo 40 ciklov; denaturacija pri 95 °C 15 sekund in naleganje začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje verige v enem koraku pri 60 °C 1 minuto. Sledila je analiza talilnih krivulj produktov PCR za namen preverjanja specifičnosti in identiteto pomnoženih mRNA. Dvigovanje temperature je potekalo od 65 – 95 °C z zviševanjem za 0,1 °C v 2 – sekundnih intervalih. Odčitavanje fluorescence se je izvajalo med fazo podaljševanja reakcije PCR in med analizo talilnih krivulj na kanalu Green.

Statistična analiza je potekala enako, kot je že opisano v poglavju 3.5.3.2. Kot referenčna gena smo uporabili *GAPDH* in *U6*, pri čemer smo kot vrednost Ct referenčnih genov upoštevali geometrijsko povprečje obeh analiziranih genov.

**Preglednica 7:** Specifični začetni oligonukleotidi za referenčna gena *GAPDH* in *U6*.

**Table 7:** Specific primers for reference genes *GAPDH* and *U6*.

| Gen          | Začetni oligonukleotid (5'- 3') F/R                     |
|--------------|---------------------------------------------------------|
| <i>GAPDH</i> | CTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCAT<br>TGGAATCATATTGGAACATGTAAACC |
| <i>U6</i>    | CTCGCTTCGGCAGCACA<br>AACGCTTCACGAATTTGCGT               |

### 3.5.5 Določevanje metilacijskega statusa promotorjev intergenskih miRNA z znižanim izražanjem in promotorjev gostiteljskih genov miRNA z znižanim izražanjem z metodo MS-HRM

Z metodo MS-HRM smo določevali metilacijski status promotorjev treh intergenskih miRNA (let-7b, miR-663a in miR-124a), ki so pokazale znižano izražanje in imajo v promotorju prisotne CpG otočke (Preglednica 8). Prav tako pa smo določevali metilacijski status promotorja gostiteljskega gena miR-338 *AATK*, ki je pokazal znižano izražanje. Celotna metoda določevanja metilacijskega statusa promotorjev je potekala enako, kot je že opisano v poglavju 3.4.4. Rezultate smo prav tako potrjevali z metodo sekvenciranja po Sangerju, kar je tudi opisano v omenjenem poglavju. Ustrezni oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili pri metodi MS-HRM in pri sekvenciranju, so navedeni v Preglednica 8.

**Preglednica 8:** Specifični začetni oligonukleotidi za določevanje metilacijskega statusa promotorskih regij miRNA z metodo MS-HRM ter dolžina produkta PCR in temperaturo naleganja. \*začetni oligonukleotid za sekvenčno reakcijo.

**Table 8:** Specific primers for MS-HRM methylation status analysis, length of PCR product and annealing temperature. \*primer used for sequencing.

| Gen         | Začetni oligonukleotid (5' - 3') F/R | Dolžina PCR produkta (bp) | Tann (°C) |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------|
| let-7b      | TTTTTTTGGTTGGTGGTTTTTT*              | 143                       | 55        |
|             | ACCACACRCACCAAAAAC                   |                           |           |
| miR-663a    | GGTGGGGAGTGTGATTTATTTT*              | 69                        | 55        |
|             | TACCCCAAACACACCTCTTAA                |                           |           |
| miR-124a    | GATGGGGGAGAATAAAGAGTTT*              | 99                        | 55        |
|             | AAAAAAAAACCACAACATCCTC               |                           |           |
| <i>AATK</i> | TTTAAAGGGTATGGGGTGG                  | 74                        | 55        |
|             | TACTCAAAAACCCTCRCCT                  |                           |           |

## 4 REZULTATI

### 4.1 BOLNIKI IN NJIHOVI KLINIČNI PODATKI

V raziskavo je bil vključen 101 bolnik s klinično diagnosticirano boleznijo ALS, 51 žensk in 50 moških. Povprečna starost ob postavitvi diagnoze bolezni je 63 let ( $\pm 11,6$  leta). Povprečna doba trajanja bolezni je bila pri 43 bolnikih 3 leta. 74 bolnikov (73 %) ima spinalno obliko bolezni, preostalih 27 pa bulbarno. 6 bolnikov (6 %) ima pridružene simptome bolezni FTD, pri 3 bolnikih (3 %) so opazili znake Alzheimerjeve bolezni in pri 2 (2 %) simptome Parkinsonove bolezni. Vsi primeri razen enega (v Preglednica 9 označen z \*) so sporadični. Iz preglednice je razvidno tudi, kateri vzorci so bili na voljo za posamezno analizo v nadaljevanju (G – gensko profiliranje, M – analiza metilacijskega statusa, mi – analiza izražanja miRNA).

**Preglednica 9:** Klinični podatki bolnikov z ALS. Vzorci, ki so bili na voljo za gensko profiliranje (G – 85 vzorcev), analizo metilacijskega statusa (M – 95 vzorcev) in analizo izražanja miRNA (mi – 84 vzorcev) so obarvani sivo. \* bolnik z dedno obliko ALS (FALS), # vzorci bolnikov, ki smo jih poslali na metilacijsko profiliranje celotnega genoma na čipu HiSeq 2000 Illumina, ZDA).

**Table 9:** Clinical data of ALS patients. Available samples for genetic profiling (G – 85 samples), methylation status analysis (M – 95 samples) and miRNA expression analysis (mi – 84 samples) are shown in grey. \* patient with familial ALS (FALS), # DNA samples of patients analysed on HiSeq 2000 chip (Illumina, USA) whole genome methylation profiling.

| Bolnik         | Spol | Starost ob postavitvi diagnoze (leta) | Oblika bolezni | G | M | mi |
|----------------|------|---------------------------------------|----------------|---|---|----|
| 1              | Ž    | 56                                    | spinalna       |   |   |    |
| 2              | Ž    | 66                                    | bulbarna       |   |   |    |
| 3              | M    | 60                                    | bulbarna       |   |   |    |
| 4              | Ž    | 71                                    | spinalna       |   |   |    |
| 5              | Ž    | 76                                    | spinalna       |   |   |    |
| 6              | Ž    | 51                                    | spinalna       |   |   |    |
| 7              | M    | 37                                    | spinalna       |   |   |    |
| 8 <sup>#</sup> | M    | 52                                    | spinalna       |   |   |    |
| 9 <sup>#</sup> | Ž    | 56                                    | bulbarna       |   |   |    |
| 10             | Ž    | 44                                    | spinalna       |   |   |    |
| 11             | M    | 84                                    | spinalna       |   |   |    |
| 12             | M    | 67                                    | spinalna       |   |   |    |
| 13             | M    | 66                                    | spinalna       |   |   |    |
| 14             | M    | 46                                    | spinalna       |   |   |    |
| 15             | M    | 40                                    | spinalna       |   |   |    |
| 16             | M    | 48                                    | bulbarna       |   |   |    |

se nadaljuje...

**Nadaljevanje preglednice 9:** Klinični podatki bolnikov z ALS.

**Continuation of table 9:** Clinical data of ALS patients.

| <b>Bolnik</b>   | <b>Spol</b> | <b>Starost ob postavitvi diagnoze (leta)</b> | <b>Oblika bolezni</b> | <b>G</b> | <b>M</b> | <b>mi</b> |
|-----------------|-------------|----------------------------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------|
| 17              | Ž           | 68                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 18              | M           | 54                                           | spinalna              |          |          |           |
| 19              | Ž           | 80                                           | spinalna              |          |          |           |
| 20              | M           | 52                                           | spinalna              |          |          |           |
| 21              | M           | 43                                           | spinalna              |          |          |           |
| 22              | Ž           | 65                                           | spinalna              |          |          |           |
| 23              | M           | 78                                           | spinalna              |          |          |           |
| 24              | M           | 49                                           | spinalna              |          |          |           |
| 25              | Ž           | 59                                           | spinalna              |          |          |           |
| 26              | Ž           | 67                                           | spinalna              |          |          |           |
| 27              | Ž           | 54                                           | spinalna              |          |          |           |
| 28              | M           | 58                                           | spinalna              |          |          |           |
| 29              | Ž           | 51                                           | spinalna              |          |          |           |
| 30              | Ž           | 82                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 31              | Ž           | 77                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 32              | Ž           | 58                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 33              | Ž           | 62                                           | spinalna              |          |          |           |
| 34              | M           | 61                                           | spinalna              |          |          |           |
| 35              | M           | 64                                           | spinalna              |          |          |           |
| 36 <sup>#</sup> | Ž           | 60                                           | spinalna              |          |          |           |
| 37              | M           | 69                                           | spinalna              |          |          |           |
| 38              | Ž           | 82                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 39              | M           | 62                                           | spinalna              |          |          |           |
| 40              | M           | 71                                           | spinalna              |          |          |           |
| 41              | M           | 56                                           | spinalna              |          |          |           |
| 42              | M           | 40                                           | spinalna              |          |          |           |
| 43              | Ž           | 68                                           | spinalna              |          |          |           |
| 44              | Ž           | 68                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 45              | M           | 61                                           | spinalna              |          |          |           |
| 46              | M           | 75                                           | spinalna              |          |          |           |
| 47              | Ž           | 52                                           | spinalna              |          |          |           |
| 48              | M           | 82                                           | spinalna              |          |          |           |
| 49              | Ž           | 89                                           | spinalna              |          |          |           |
| 50              | Ž           | 76                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 51              | M           | 63                                           | spinalna              |          |          |           |
| 52              | Ž           | 70                                           | spinalna              |          |          |           |
| 53              | M           | 75                                           | spinalna              |          |          |           |
| 54              | Ž           | 81                                           | spinalna              |          |          |           |
| 55              | M           | 67                                           | spinalna              |          |          |           |
| 56              | Ž           | 70                                           | spinalna              |          |          |           |
| 57              | M           | 58                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 58              | Ž           | 63                                           | spinalna              |          |          |           |

se nadaljuje...

**Nadaljevanje preglednice 9:** Klinični podatki bolnikov z ALS.

**Continuation of table 9:** Clinical data of ALS patients.

| <b>Bolnik</b> | <b>Spol</b> | <b>Starost ob postavitvi diagnoze (leta)</b> | <b>Oblika bolezni</b> | <b>G</b> | <b>M</b> | <b>mi</b> |
|---------------|-------------|----------------------------------------------|-----------------------|----------|----------|-----------|
| 59            | M           | 67                                           | spinalna              |          |          |           |
| 60            | M           | 67                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 61            | Ž           | 57                                           | spinalna              |          |          |           |
| 62            | M           | 55                                           | spinalna              |          |          |           |
| 63            | M           | 46                                           | spinalna              |          |          |           |
| 64            | Ž           | 72                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 65            | M           | 46                                           | spinalna              |          |          |           |
| 66            | Ž           | 55                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 67            | M           | 66                                           | spinalna              |          |          |           |
| 68            | M           | 39                                           | spinalna              |          |          |           |
| 69            | M           | 62                                           | spinalna              |          |          |           |
| 70            | Ž           | 65                                           | spinalna              |          |          |           |
| 71            | M           | 70                                           | spinalna              |          |          |           |
| 72 #          | M           | 38                                           | spinalna              |          |          |           |
| 73            | M           | 59                                           | spinalna              |          |          |           |
| 74            | Ž           | 80                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 75            | M           | 60                                           | spinalna              |          |          |           |
| 76            | Ž           | 65                                           | spinalna              |          |          |           |
| 77            | M           | 63                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 78            | M           | 70                                           | spinalna              |          |          |           |
| 79            | Ž           | 77                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 80            | Ž           | 85                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 81            | Ž           | 45                                           | spinalna              |          |          |           |
| 82            | M           | 79                                           | spinalna              |          |          |           |
| 83            | M           | 60                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 84            | M           | 50                                           | spinalna              |          |          |           |
| 85            | Ž           | 62                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 86            | M           | 75                                           | spinalna              |          |          |           |
| 87            | M           | 61                                           | spinalna              |          |          |           |
| 88            | Ž           | 61                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 89            | M           | 72                                           | spinalna              |          |          |           |
| 90            | Ž           | 55                                           | spinalna              |          |          |           |
| 91            | Ž           | 62                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 92            | Ž           | 66                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 93            | Ž           | 57                                           | spinalna              |          |          |           |
| 94            | Ž           | 72                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 95            | Ž           | 70                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 96 *          | Ž           | 57                                           | spinalna              |          |          |           |
| 97            | Ž           | 70                                           | bulbarna              |          |          |           |
| 98            | Ž           | 58                                           | spinalna              |          |          |           |
| 99            | M           | 57                                           | spinalna              |          |          |           |
| 100           | Ž           | 52                                           | spinalna              |          |          |           |
| 101           | Ž           | 78                                           | spinalna              |          |          |           |

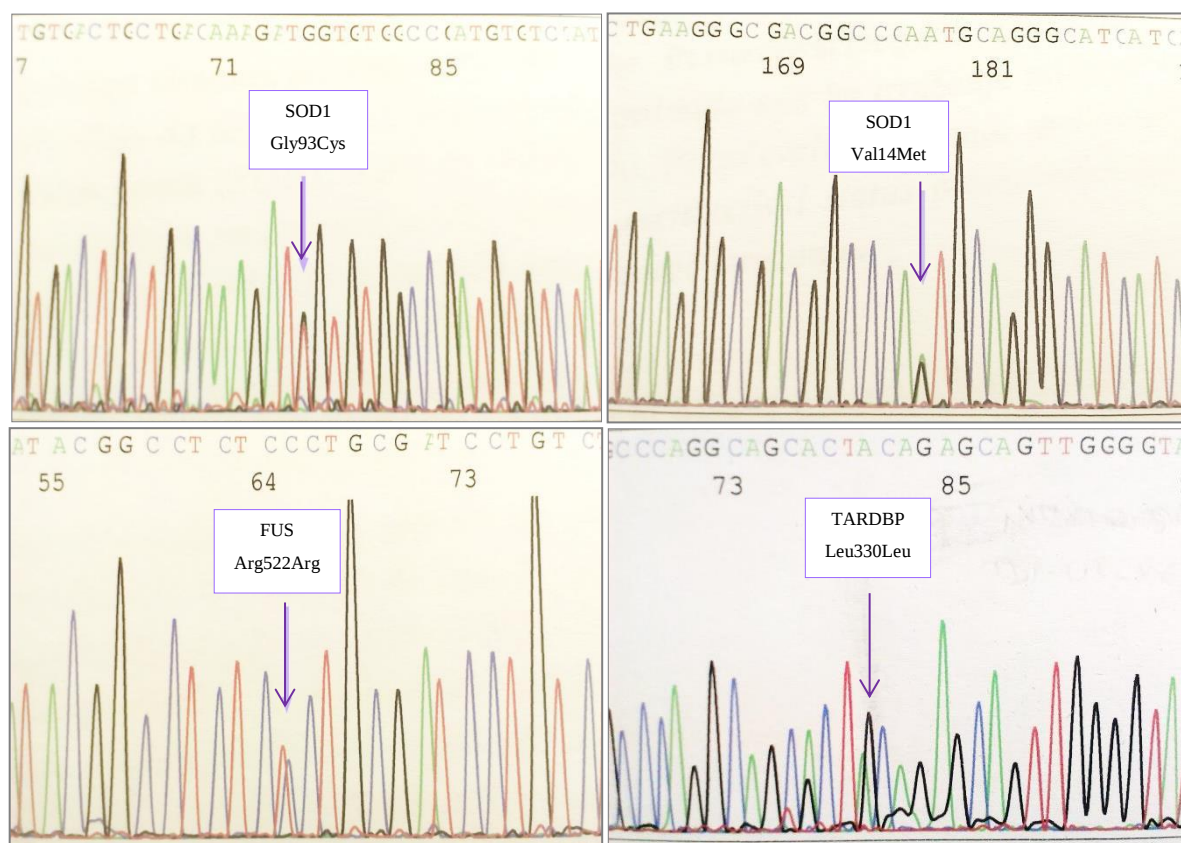
#### 4.2 SPREMEMBE V GENIH *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* IN *C9ORF72*

Pri 85 bolnikih smo z metodo sekvenciranja po Sangerju v kodirajočih regijah genov *SOD1*, *TARDBP* in *FUS* odkrili 4 spremembe pri treh bolnikih (Preglednica 10 in Slika 11). V genu *SOD1* smo zaznali 2 mutaciji, in sicer p.Val14Met in p.Gly93Cys. V genih *FUS* in *TARDBP* smo našli 2 sinonimni zamenjavi, 1 v genu *TARDBP* (c.990A>G, p.Leu330Leu) in 1 v genu *FUS* (c.1566G>A, p.Arg522Arg). Zamenjava v genu *TARDBP* predhodno še ni bila opisana in jo tako prvič navajamo v svoji publikaciji (Vrabec in sod., 2015). Odkrita je bila pri bolnici z mutacijo p.Gly93Cys v genu *SOD1*. Razširitve heksanukleotidnih ponovitev v prvem intronu gena *C9ORF72* smo ugotovili pri 5-ih bolnikih.

**Preglednica 10:** Genetske spremembe, ki smo jih zaznali pri bolnikih z ALS, in njihovi klinični podatki. Fr. – frekvenca zaznane spremembe, Sp – spol.

**Table 10:** Genetic changes detected in ALS patients and their clinical data. Fr. – frequency of genetic change, Sp – gender (Ž – female, M – male).

| Bolnik | Gen            | Nukleotidna sprememba | Sprememba AK | Fr. (%) | Sp | Oblika; starost ob začetku; trajanje bolezni; pridruženi simptomi | Vir                     |
|--------|----------------|-----------------------|--------------|---------|----|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 26     | <i>SOD1</i>    | c.43 G>A              | p.Val14Met   | 2,3     | Ž  | spinalna; 67 let; 4+ let                                          | (Deng in sod., 1995)    |
| 29     |                | c.280 G>T             | p.Gly93Cys   |         | Ž  | spinalna; 51 let; 5+ let                                          | (Rosen, 1993)           |
|        | <i>TARDBP</i>  | c.990 A>G             | p.Leu330Leu  | 1,2     |    |                                                                   | (Vrabec in sod., 2015)  |
| 11     | <i>FUS</i>     | c.1566 G>A            | p.Arg522Arg  | 1,2     | M  | spinalna; 84 let; 1 leto                                          | (Ticozzi in sod., 2009) |
| 8      | <i>C9ORF72</i> | razširitev GGGGCC     |              | 5,9     | M  | spinalna; 52 let; 0.5 leta                                        | (Renton in sod., 2011)  |
| 36     |                |                       |              |         | Ž  | spinalna; 60 let; 6+ let                                          |                         |
| 45     |                |                       |              |         | M  | spinalna; 61 let; 2+ leti; FTD                                    |                         |
| 66     |                |                       |              |         | Ž  | bulbarna; 55 let; 2 leti                                          |                         |
| 71     |                |                       |              |         | M  | spinalna; 70 let; 1 leto                                          |                         |



**Slika 11:** Genetske spremembe, najdene pri bolnikih z ALS v genih *SOD1*, *FUS* in *TARDBP*. V genu *FUS* gre za sinonimno zamenjavo c.1566G>A, v genu *TARDBP* pa smo odkrili novo, prav tako sinonimno zamenjavo c.990A>G, prvič opisano v naši študiji (Vrabec in sod., 2015).

**Figure 11:** Genetic changes of *SOD1*, *FUS* and *TARDBP* genes detected in ALS patients. Two synonymous substitutions were detected, c.1566G>A in *FUS* gene and novel c.990A>G in *TARDBP* gene, published in our study (Vrabec et al., 2015).

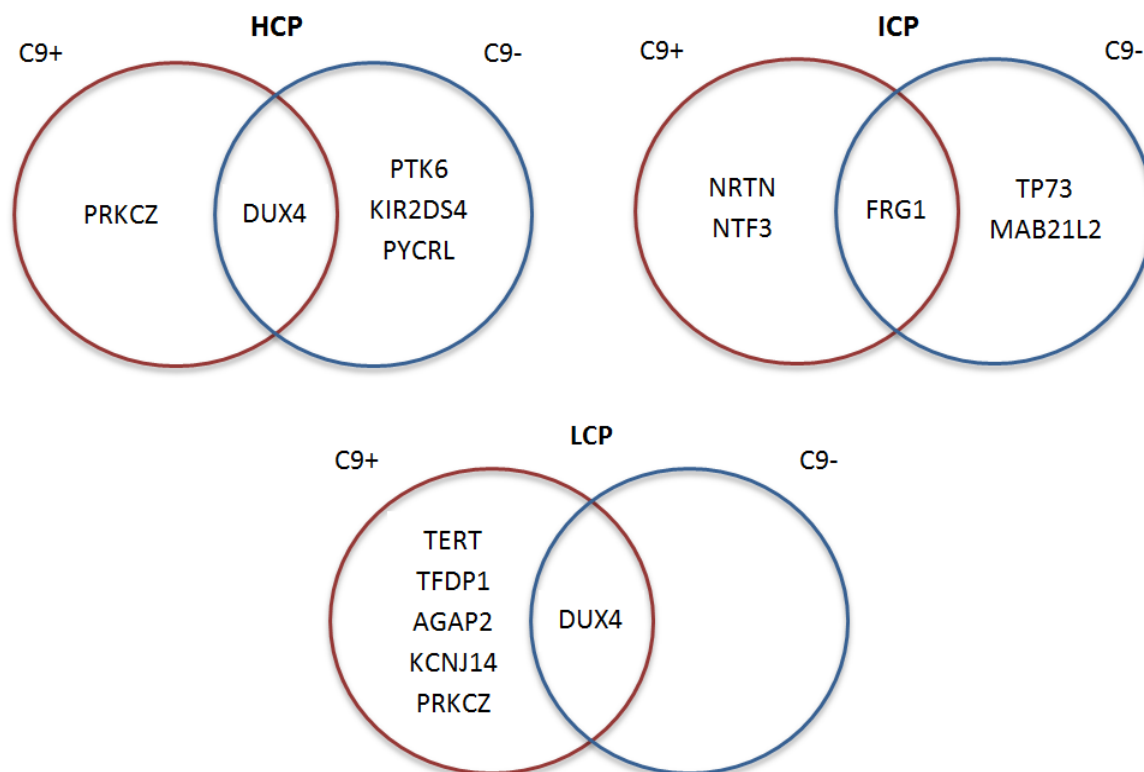
### 4.3 METILACIJSKI STATUS GENOV PRI BOLNIKI Z ALS

#### 4.3.1 Metilacijsko profiliranje celotnega genoma

Analiza metilacijskega profiliranja celotnega genoma na čipu HiSeq (Illumina, ZDA) je bila izvedena na 4-ih vzorcih bolnikov z ALS, v Preglednica 9 so označeni z <sup>#</sup>. Pri dveh bolnikih (ženska - 36 in moški - 8) smo predhodno pri genskem profiliranju zaznali prisotnost razširitve heksanukleotidnih ponovitev v genu *C9ORF72*, pri drugih dveh (ženska - 9 in moški - 72) pa nismo zaznali sprememb v nobenem od 4-ih analiziranih genov. Iz rezultatov smo po statistični analizi dobili seznam kandidatnih genov, ki so bili glede na tip promotorja (HCP, ICP in LCP) najbolj metilirani. Kot zanimive za nadaljnjo analizo smo izbrali gene, ki:

- se pojavljajo kot metilirani pri vseh vzorcih;

- se pojavljajo kot metilirani pri enem tipu promotorja;
- se pojavljajo kot metilirani pri bolnikih s prisotno razširitvijo heksanukleotidnih ponovitev v genu *C9ORF72*, ne pa pri bolnikih brez zaznane mutacije in obratno.



**Slika 12:** Shematski prikaz izbora genov za validacijo z metodo MS-HRM glede na izbrane kriterije. HCP, ICP in LCP so tipi promotorjev glede na gostoto CpG dinukleotidov. C9+ sta vzorca 8 in 36 z detektirano spremembo v genu *C9ORF72*, C9- pa vzorca 9 in 72 brez zaznanih sprememb v 4-ih analiziranih genih.

**Figure 12:** A schematic illustration of gene selection for MS-HRM analysis according to chosen criteria. HCP, ICP and LCP are promoter types according to CpG dinucleotide density. C9+ are samples 8 and 36 with detected repeat expansion in *C9ORF72* gene, C9- are samples with no detected genetic change in none of the four analysed genes.

Za vse gene, ki so ustrezali zgornjim omejitvam, smo v spletnih bazah podatkov poiskali podatke o vlogi, funkciji, morebitni vpletenosti v procese nevrodegeneracije, apoptoze ali že znane povezave s katero od bolezni, ki je podobna ALS. Ena takšnih bolezni je mišična distrofija obraznih mišic in mišic zgornjega dela hrbta (angl. facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD). Z upoštevanjem omenjenih kriterijev, smo izmed vseh kandidatnih genov za validacijo metiliranosti njihovih promotorjev z metodo MS-HRM izbrali 14 genov (Slika 12 in Preglednica 11).

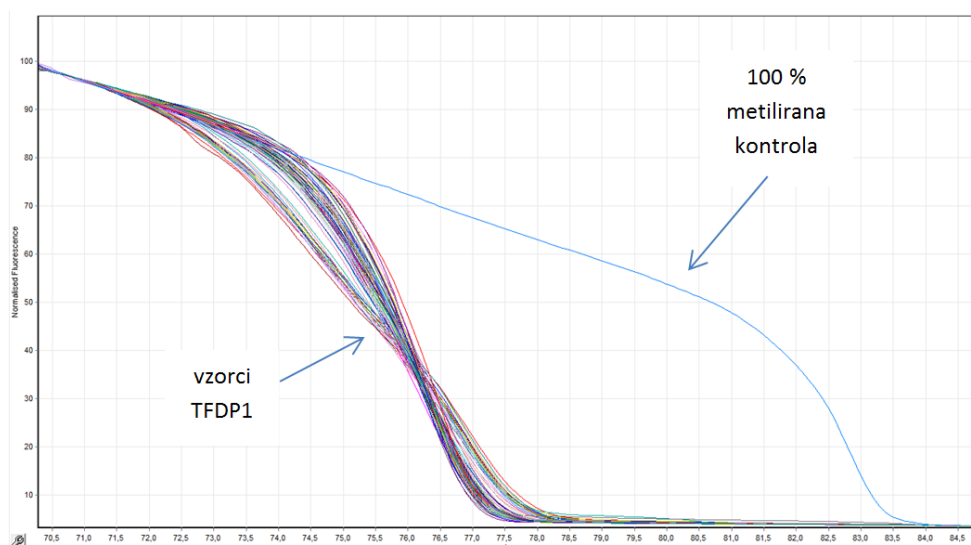
**Preglednica 11:** Seznam izbranih 14 genov skupaj z značilnostmi, ki so razlog za njihov izbor za nadaljnjo validacijo metilacijskega statusa promotorjev z metodo MS-HRM skupaj z rezultati (M – metiliran, N – nemetilirani). Navajamo tudi tip promotorja gena in pri katerih vzorcih je bila zaznana metilacija. C9+ sta vzorca 8 in 36 z detektirano spremembo v genu *C9ORF72*, C9- pa vzorca 9 in 72 brez zaznanih sprememb v 4-ih analiziranih genih.

**Table 11:** List of 14 genes together with their functions for which they were chosen for further analysis with MS-HRM together with results (M – methylated, N – unmethylated). The table also provides promoter type and samples found to have methylated promoters. C9+ are samples 8 and 36 with detected repeat expansion in *C9ORF72* gene, C9- are samples with no detected genetic change in any of four genes analysed.

| Gen            | Vloga, značilnosti                                                                                                               | Tip promotorja | Vzorci | M/N |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------|-----|
| <i>DUX4</i>    | normalno utišan, zvišano izražanje v mioblastih pri FSHD                                                                         | HCP, LCP       | vsi    | M   |
| <i>FRG1</i>    | zvišano izražanje pri FSHD                                                                                                       | ICP            | vsi    | N   |
| <i>PTK6</i>    | vloga pri celični diferenciaciji in apoptozi                                                                                     | HCP            | C9-    | N   |
| <i>AGAP2</i>   | vloga pri antiapoptotičnih učinkih živčnega rastnega faktorja, zvišano izražanje v rakavih celicah                               | LCP            | C9+    | M   |
| <i>KCNJ14</i>  | verjetno ima vlogo pri kontroli vzburjenosti motoričnih nevronov                                                                 | LCP            | C9+    | M   |
| <i>TFDP1</i>   | transkripcijski kofaktor v (živčnih) celicah                                                                                     | LCP            | C9+    | N   |
| <i>NRTN</i>    | spodbuja preživetje populacij živčnih celic                                                                                      | ICP            | C9+    | M   |
| <i>NTF3</i>    | nadzira preživetje in diferenciacijo nevronov, pri odraslih naj bi bil vpleten v procese vzdrževanja živčnega sistema            | ICP            | C9+    | N   |
| <i>TP73</i>    | vpliva na apoptozo, ki je verjetni patogeni mehanizem pri ALS                                                                    | ICP            | C9-    | N   |
| <i>PRKCZ</i>   | potreben za diferenciacijo akson-dendrit, del nevrotrofinske signalne poti                                                       | HCP, LCP       | C9+    | N   |
| <i>KIR2DS4</i> | povezan s sindromom Klippel-Feil, ki povzroča spremembe v glavi, kosteh, mišicah, možganih, hrbtenjači, v rokah, nogah in prstih | HCP            | C9-    | M   |
| <i>PYCRL</i>   | povezan z boleznijo giratna atrofija, pri kateri se pojavlja mišična šibkost                                                     | HCP            | C9-    | M   |
| <i>TERT</i>    | povezan z ponovno aktivacijo telomeraze, kar prepreči nevrodegeneracijo                                                          | LCP            | C9+    | M   |
| <i>MAB21L2</i> | verjetno vpleten v razvoj živčnega sistema                                                                                       | ICP            | C9-    | M   |

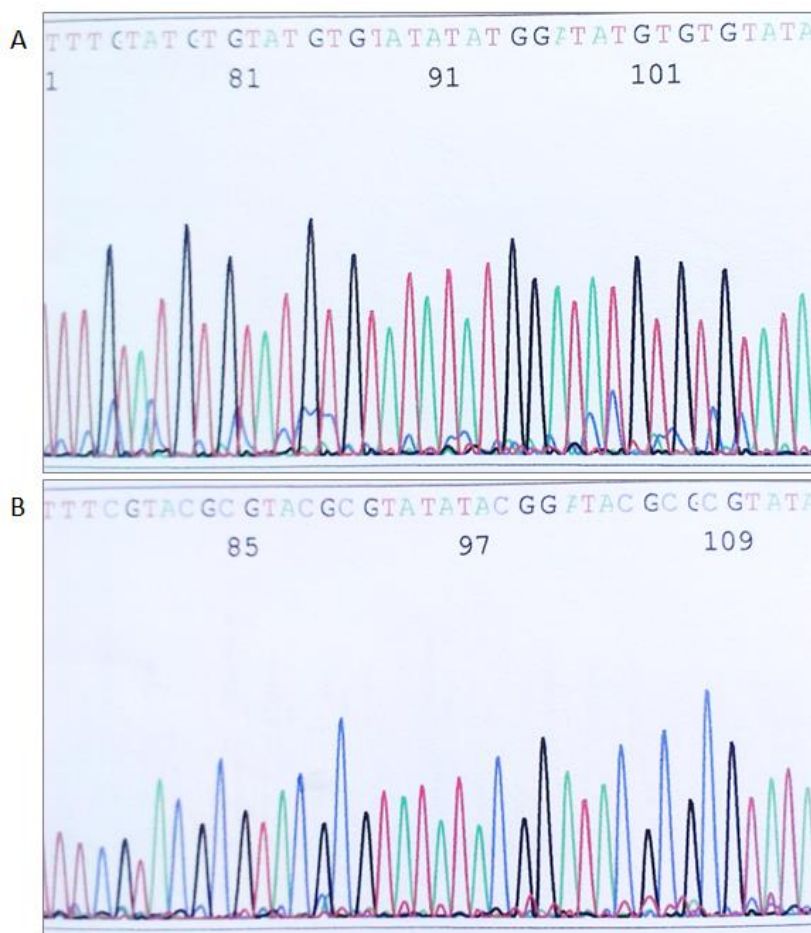
#### 4.3.2 Analiza metilacijskega statusa promotorjev z metodo MS-HRM in sekvenciranjem po Sangerju

Z uporabo metode MS-HRM smo pri bolnikih z ALS določevali prisotnost metiliranih odsekov v promotorjih 14-ih izbranih genov, ki so skupaj z rezultati navedeni v Preglednica 11. V genih *DUX4*, *AGAP2*, *KCNJ14*, *NRTN*, *KIR2DS4*, *PYCRL*, *TERT* in *MAB21L2* so bili preiskovani odseki v promotorju metilirani, v genih *FRG1*, *PTK6*, *TFDP1*, *NTF3*, *TP73* in *PRKCZ* pa nemetilirani pri vseh vzorcih bolnikov z ALS. Rezultate smo potrdili tudi z metodo sekvenciranja po Sangerju. Analiza metilacijskega statusa je na primeru gena *TFDP1* prikazana na Slikah 13 in 14.



**Slika 13:** Primer analize gena *TFDP1* z metodo MS-HRM. Vidna je zelo visoka razlika v talilni temperaturi med nemetiliranimi vzorci in 100 % metilirano pozitivno kontrolo. X os – talilna temperatura, Y os – intenziteta fluorescence.

**Figure 13:** Example of MS-HRM analysis of *TFDP1* gene. Melting temperatures between unmethylated samples and 100 % methylated positive control differ greatly. X axis – melting temperature, Y axis – fluorescence intensity.



**Slika 14:** Potrditev rezultatov MS-HRM z metodo sekvenciranja po Sangerju za gen *TFDP1*. A – nemetiliran vzorec, B – 100 % metilirana pozitivna kontrola. Prikazan je isti odsek zaporedja.

**Figure 14:** Sanger sequencing of *TFDP1* gene from MS-HRM results conformation. A - unmethylated sample, B – 100 % methylated positive control. Sequence shown in A and B is in identical position.

#### 4.4 ANALIZA IZRAŽANJA miRNA IN NJIHOVIH GOSTITELJSKIH GENOV

##### 4.4.1 Izražanje miRNA v vzorcih bolnikov z ALS in rezultati statistične analize

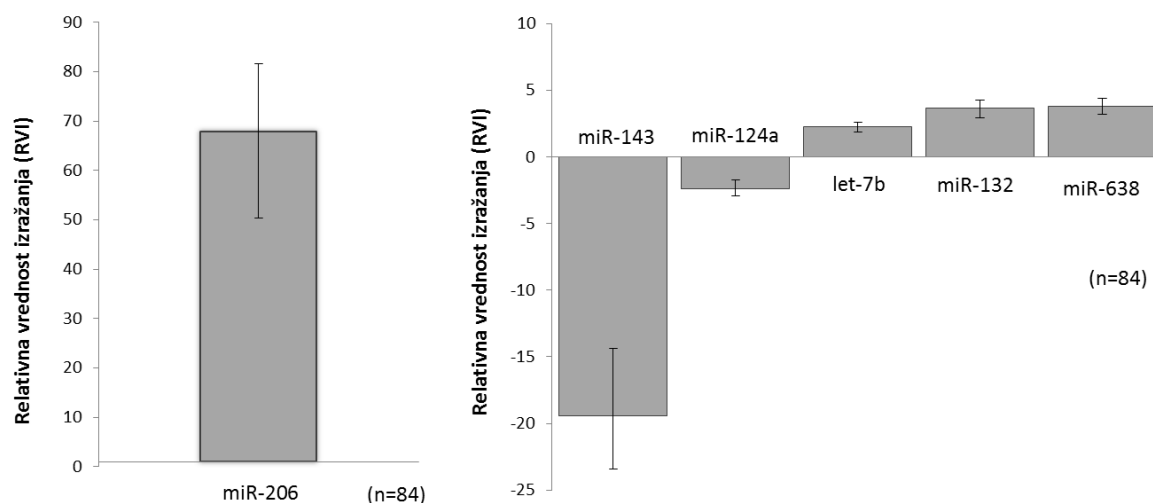
Za analizo izražanja miRNA v vzorcih bolnikov z ALS smo izbrali 10 miRNA, ki jih navajamo v Preglednica 12 skupaj z rezultati izražanja posamezne miRNA z metodo qPCR. Vse analizirane miRNA smo primerjali glede na referenčno RNA (zdravi posamezniki). Relativno vrednost izražanja (RVI) miRNA smo določili kot  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Navajamo tudi regijo, v kateri se miRNA nahaja in v primeru intragenske miRNA tudi njej gostiteljski gen ter morebitno prisotnost CpG otočkov v promotorju gostiteljskega gena, za intergenske miRNA pa prisotnost CpG otočkov v promotorju miRNA.

**Preglednica 12:** Seznam analiziranih miRNA z metodo qPCR s pripadajočo regijo. Za intragenske miRNA navajamo tudi njen gostiteljski gen in prisotnost CpG otočka v promotorju gostiteljskega gena oziroma v promotorju miRNA v primeru intergenske miRNA. \*na podlagi rezultatov izražanja izbrane miRNA za nadaljnje analize.

**Table 12:** List of analysed miRNA and their regions. Host gene is provided for intragenic miRNA and also the presence of CpG island in the promoter of host gene or the presence of CpG island in the promoter of intergenic miRNA. \*miRNA chosen for further analysis on the basis of qPCR result analysis.

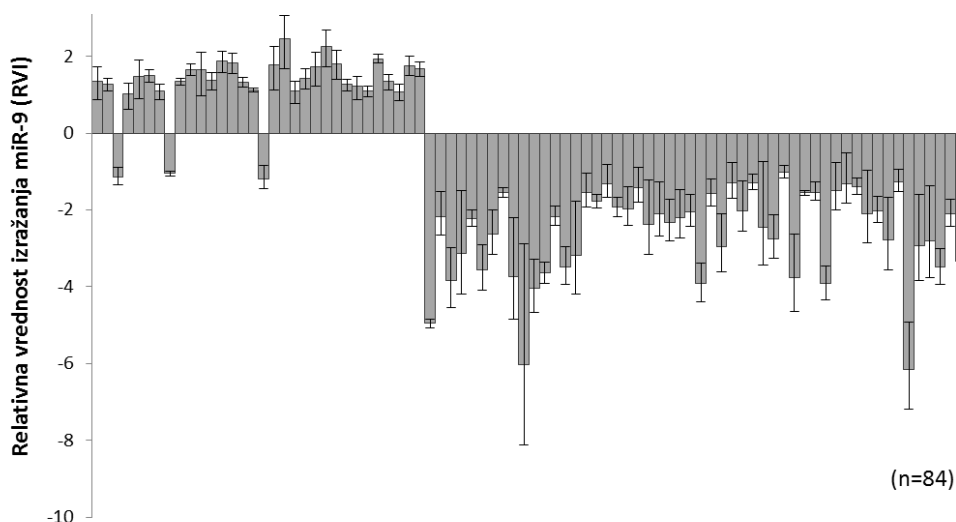
| miRNA     | Simbol        | Izražanje miRNA z metodo qPCR | Regija      | Gostiteljski gen; prisotnost CpG v gostiteljskem genu/miRNA | Vir                         |
|-----------|---------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| let-7b    | hsa-let-7b    | večinoma zvišano              | intergenska | CpG prisoten                                                | (Buratti in sod., 2010)     |
| miR-9*    | hsa-mir-9-1   | 1/2 zvišano, 1/2 znižano      | intragenska | <i>C1orf61</i> ; ni CpG v promotorju                        | (Zhou in sod., 2013)        |
| miR-132   | hsa-mir-132   | zvišano                       | intergenska | CpG prisoten                                                | (Lungu in sod., 2013)       |
| miR-206   | hsa-mir-206   | zvišano                       | intergenska | ni CpG v promotorju                                         | (Williams in sod., 2009)    |
| miR-638*  | hsa-mir-638   | zvišano                       | intragenska | <i>DNM2</i> ; CpG prisoten                                  | (Freischmidt in sod., 2014) |
| miR-663a* | hsa-mir-663a  | 1/2 zvišano, 1/2 znižano      | intergenska | CpG prisoten                                                | (Buratti in sod., 2010)     |
| miR-124a* | hsa-mir-124-1 | znižano                       | intergenska | CpG prisoten                                                | (Marcuzzo in sod., 2014)    |
| miR-143   | hsa-miR-143   | znižano                       | intergenska | ni CpG v promotorju                                         | (Freischmidt in sod., 2013) |
| miR-338*  | hsa-mir-338   | večinoma znižano              | intragenska | <i>AATK</i> ; CpG prisoten                                  | (De Felice in sod., 2014)   |
| miR-451a  | hsa-mir-451a  | večinoma znižano              | intergenska | ni CpG v promotorju                                         | (De Felice in sod., 2012)   |

Zaznali smo znižano izražanje miR-143 pri vseh vzorcih z izjemo enega. Znižano izražanje je pri vseh vzorcih bolnikov pokazala tudi miR-124a, medtem ko smo pri let-7b (z izjemo 5-ih vzorcev), pri miR-132 (z izjemo 1 vzorca) in pri miR-638 zaznali zvišano izražanje pri bolnikih z ALS. Izrazito zvišanje izražanja je pokazala miR-206, ki jo zaradi višje relativne vrednosti izražanja prikazujemo ločeno (Slika 15). Pri miR-9, miR-338, miR-451a in miR-663a pa smo zaznali različno izražanje med vzorci. Njihove relativne vrednosti izražanja prikazujejo Slike 16, 17 in 18.



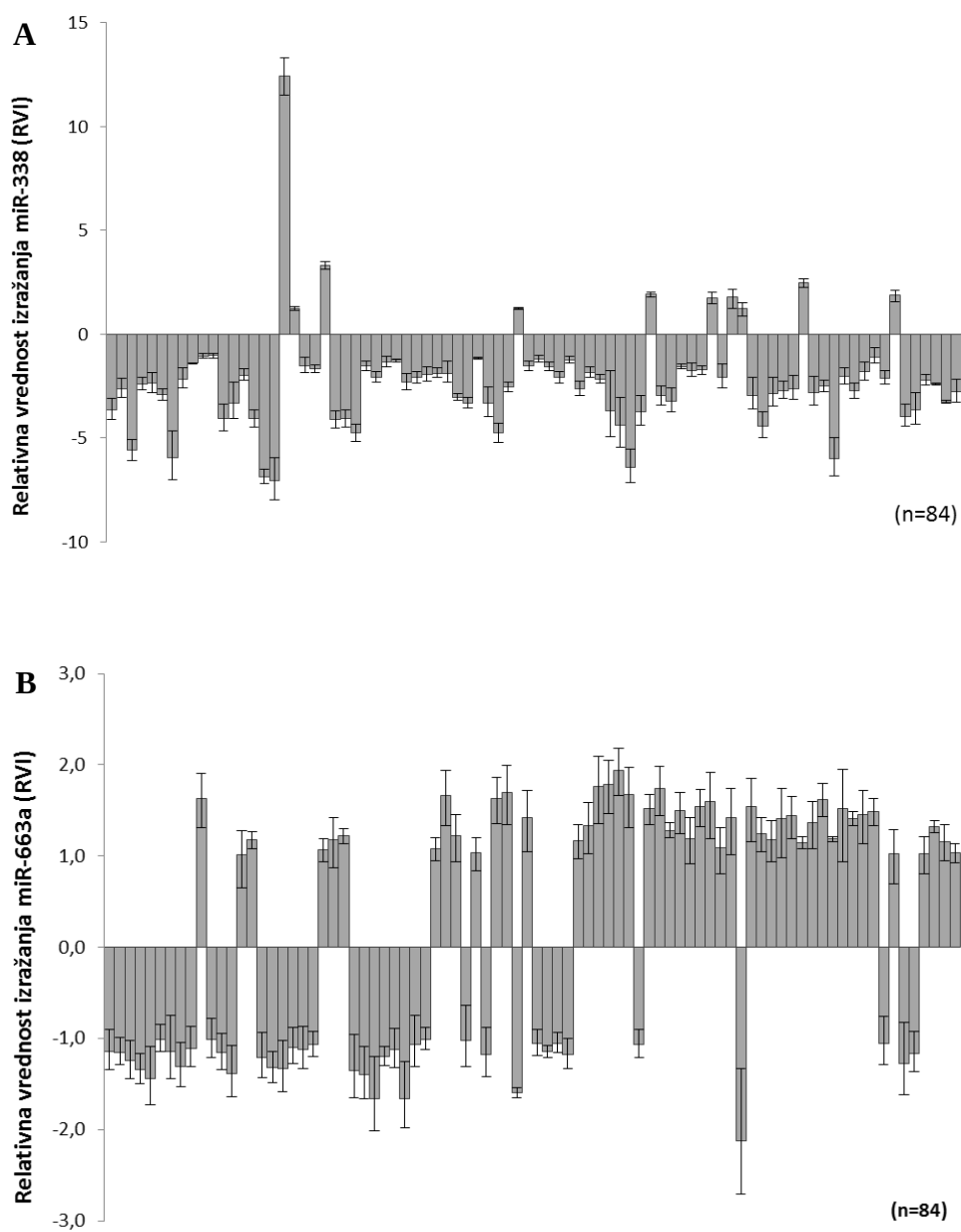
**Slika 15:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) miRNA na vzorcih bolnikov z ALS. Vsi rezultati so primerjani glede na referenčne vzorce zdravih posameznikov. MiR-206 ima izrazito zvišano izražanje pri vseh vzorcih bolnikov (levo). Zvišano izražanje se je pokazalo tudi pri let-7b (z izjemo 5-ih vzorcev), pri miR-132 (z izjemo 1 vzorca) in pri miR-638, medtem ko sta miR-143 (z izjemo 1 vzorca) in miR-124a znižano izraženi (desno).

**Figure 15:** Relative expression (RVI) of miRNA of ALS patients. The results are normalized to reference RNA of healthy controls. MiR-206 is up-regulated greatly in all samples of ALS patients (left). Let-7b (except 5 samples), miR-132 (except 1 sample) and miR-638 were also up-regulated while miR-143 (except 1 sample) and miR-124a were down-regulated (right).



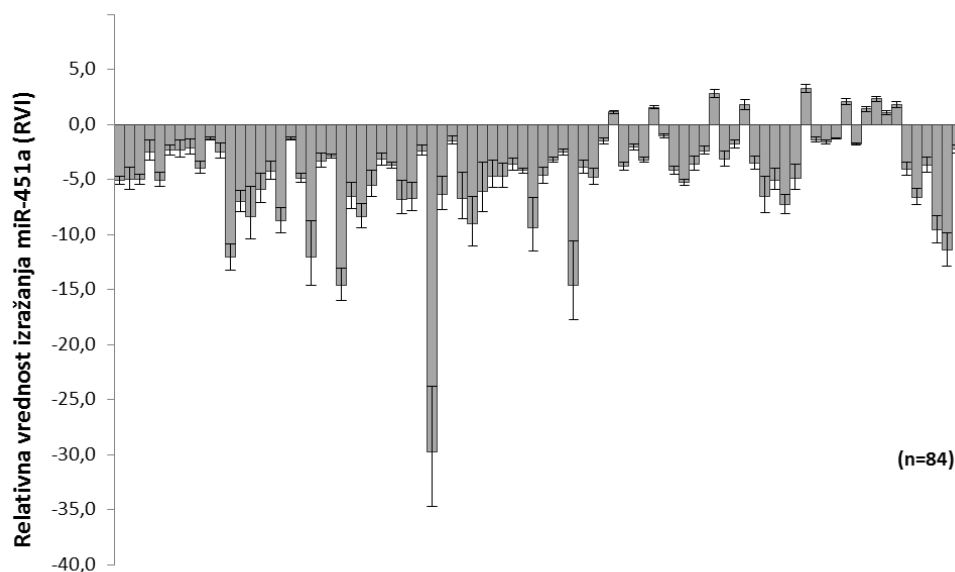
**Slika 16:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-9. Vsak stolpec predstavlja enega bolnika z ALS.

**Figure 16:** Relative expression (RVI) of miR-9. Each column represents one ALS patient.



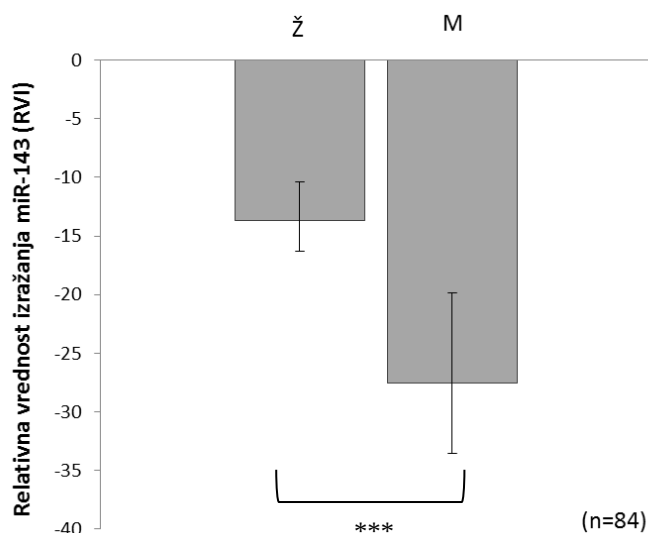
**Slika 17:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-338 (A) in miR-663a (B). Vsak stolpec predstavlja enega bolnika z ALS.

**Figure 17:** Relative expression (RVI) of miR-338 (A) and miR-663a (B). Each column represents one ALS patient.



**Slika 18:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-451a. Vsak stolpec predstavlja enega bolnika z ALS.  
**Figure 18:** Relative expression (RVI) of miR-451a. Each column represents one ALS patient.

Spremembe v izražanju miRNA smo statistično ovrednotili. Uporabili smo parametrično metodo t-test in statistični test Mann-Whitney za nepravne vzorce. Primerjali smo izražanje posamezne miRNA glede na spol bolnikov, prisotnost mutacije in glede na obliko bolezni (spinalna ali bulbarna). Če je bila vrednost  $p < 0,05$ , smo spremembe v izražanju miRNA pri preučevanih bolnikih v primerjavi z zdravimi (referenčna RNA) opredelili kot statistično značilne. Pri vseh vzorcih smo primerjali vrednosti  $\Delta\Delta C_t$ . Izražanje miR-143 se statistično značilno razlikuje med moškimi in ženskami (Slika 19), in sicer je pri moških RVI statistično značilno nižja kot pri ženskah ( $p=0,001$ ). Število bolnic in bolnikov je enako (42 žensk in 42 moških). Pri ostalih miRNA za izbrane parametre (spol, prisotnost mutacije in oblika bolezni) nismo našli statistično značilnih razlik.



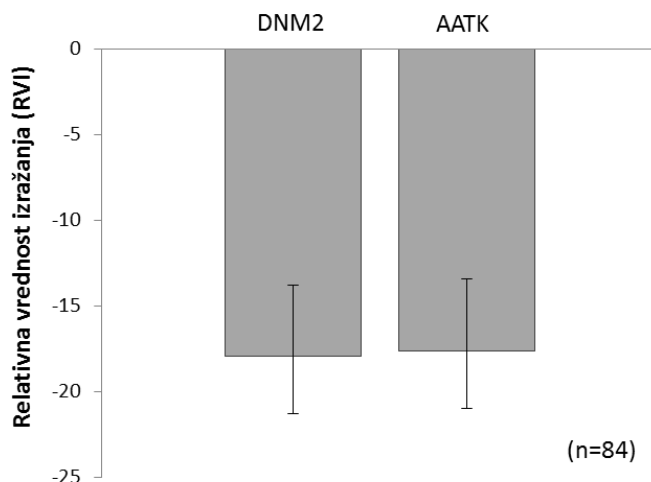
**Slika 19:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) miR-143 po spolu. Pri moških se miR-143 statistično značilno izraža manj kot pri ženskah ( $p=0,001$ ). Število bolnic in bolnikov je po spolu enako (42 žensk in 42 moških).  
**Figure 19:** Relative expression (RVI) of miR-143 according to gender. miR-143 is significantly more down-regulated in male patients compared to female ( $p=0,001$ ). Number of females equals male patients (42 females and 42 males).

V nadaljevanju smo glede na dobljene rezultate analize z metodo qPCR izbrali miRNA, ki imajo znižano izražanje. Za intragenske miRNA nas je zanimalo izražanje njihovega gostiteljskega gena, intergenskim pa smo z metodo MS-HRM določili metilacijski status promotorja v kolikor je imela miRNA prisoten CpG otoček v promotorju. Odločili pa smo se tudi za določevanje izražanja gostiteljskega gena *DNM2* kljub dejstvu, da je njegova miR-638 pokazala zvišano izražanje (v Preglednica 12 so z \* označene miRNA, ki smo jih nadalje analizirali).

#### 4.4.2 Izražanje gostiteljskih genov *C1ORF61*, *DNM2* in *AATK* intragenskih miRNA

Intragenskima miRNA, ki smo jima z metodo qPCR določili znižano izražanje, sta miR-9 in miR-338, miR-638 pa je pokazala zvišano izražanje v vzorcih bolnikov ALS. Gostiteljski gen miR-9 je gen *C1ORF61*, miR-338 se nahaja znotraj gena *AATK*, miR-638 pa znotraj gena *DNM2*. Gen *C1ORF61* se ne izraža v krvnih vzorcih bolnikov z ALS, prav tako ne na referenčni RNA, tako da zanj nismo mogli narediti analize izražanja. Pri genih *AATK* in *DNM2* pa smo po analizi s qPCR zaznali znižano izražanje pri vseh bolnikih z ALS v primerjavi z zdravimi posamezniki. Relativno vrednost izražanja (RVI) obeh genov prikazuje Slika 20. Iz rezultatov je razvidno, da se gen *AATK* znižano izraža tudi pri bolnikih, pri katerih je miR-338 pokazala zvišano izražanje ( $n=10$ ). MiR-638 in njen gostiteljski gen *DNM2* pa sta obratno izražena, saj je bila miRNA zvišano izražena, njen gostiteljski gen pa ima znižano izražanje pri vseh bolnikih z ALS. Spremembe v izražanju

gostiteljskih genov smo statistično ovrednotili enako kot pri miRNA glede na spol, prisotnost mutacije in obliko bolezni, vendar statistično značilnih razlik nismo zaznali.



**Slika 20:** Relativne vrednosti izražanja (RVI) gostiteljskih genov *DNM2* (miR-638) in *AATK* (miR-338).  
**Figure 20:** Relative expression (RVI) of miRNA host genes *DNM2* (miR-638) and *AATK* (miR-338).

#### 4.4.3 Analiza metilacijskega statusa promotorja gena *AATK* in intergenskih miRNA

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali je znižano izražanje gostiteljskega gena *AATK* miR-338 posledica metiliranega promotorja gena. Ugotovili smo, da je promotor gena *AATK* metiliran. Z istim razlogom pa smo določevali tudi metilacijski status promotorjev intergenskih miRNA, in sicer miR-663a in miR-124a. Pomnoženi promotorski regiji obeh miRNA sta se izkazali za nemetilirani. Vse analize smo izvedli z metodo MS-HRM, rezultate pa potrdili z metodo sekvenciranja po Sangerju.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 ANALIZA SPREMEMB V GENIH *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* IN *C9ORF72* PRI BOLNIKI Z ALS

Na prisotnost sprememb v genih *SOD1*, *FUS*, *TARDBP* IN *C9ORF72* smo analizirali 85 od skupno 101 bolnika z ALS. Ta študija predstavlja prvo raziskavo na vzorcih slovenskih bolnikov, od katerih vsi z izjemo enega spadajo v skupino sporadičnih primerov, saj ne izpolnjujejo kriterijev za dedno obliko bolezni (Byrne in sod., 2011). Opazili smo enako zastopanost po spolu ( $\bar{Z}=51$ ,  $M=50$ ), čeprav navadno moški zbolijo pogostejše kot ženske ( $M:\bar{Z}=1,25$ ) (Logroscino in sod., 2010). Pri moških poročajo tudi o pogostejši spinalni obliki bolezni (Logroscino in sod., 2010), s čimer se skladajo tudi naši rezultati, kjer ima le 12 % moških (6 bolnikov) bulbarno obliko bolezni.

Z metodo sekvenciranja po Sangerju smo zaznali 4 spremembe v genih *SOD1*, *TARDBP* in *FUS* pri skupno treh bolnikih, od tega v genu *SOD1* 2 spremembi, p.Val14Met (Deng in sod., 1995) in p.Gly93Cys (Rosen, 1993). Pri bolniku z mutacijo p.Gly93Cys smo odkrili tudi še neopisano nukleotidno spremembo c.990A>G v genu *TARDBP*, ki pa nima vpliva na aminokislino (p.Leu330Leu). Ta sinonimna zamenjava je očitno izredno redka, saj ni navedena v splošno dostopnih spletnih bazah podatkov, kot so dbSNP in 1000 Genomes, prav tako pa ni prisotna pri nobenem od 6503 posameznikov, ki sestavljajo eksomsko bazo podatkov Exome Variant Server. Analiza *in silico* s programom ESEfinder 3.0 (Smith in sod., 2006a) je pokazala, da bi sprememba c.990A>G v genu *TARDBP* lahko vplivala na proces izrezovanja intronov. Točkovne mutacije lahko pripeljejo do napačnega izrezovanja pre-mRNA in tako lahko vodijo v bolezen. Tudi v primeru sinonimne zamenjave, ko zaradi točkovne mutacije ne pride do spremembe aminokislino, posledice niso zanemarljive. Lahko se spremeni stabilnost mRNA in posledično količina proteinov (Nackley in sod., 2006) ali pa se spremeni prepoznavno zaporedje za miRNA, ki vodi v porušenje uravnavanja izražanja tarčnega gena (Hurst, 2006). Sinonimne zamenjave lahko vodijo v razlike izražanja zaradi fenomena različne rabe kodonov (angl. codon usage oziroma codon bias). Tako imajo kodoni za isto aminokislino lahko različno frekvenco uporabe oziroma tudi koncentracijo ustreznih tRNA, kar lahko vpliva na razlike v učinkovitosti translacije. Nekateri zadnji članki potrjujejo tudi ta vpliv (Park in sod., 2012). Takšne zamenjave lahko vplivajo na vezavo eksonskih ojačevalcev izrezovanja intronov (ang. exonic splicing enhancer, ESE), kar lahko vodi v preskakovanje eksonov (Cartegni in sod., 2003). Za predvidevanje vpliva te spremembe na izrezovanje intronov smo uporabili še program NetGene2. To je predikcijsko orodje, ki s 95 % natančnostjo napove mesta izrezovanja intronov (predvidi donorska in akceptorska zaporedja), pri čimer je vrednost lažno pozitivnih rezultatov manjša od 0,4 % (Brunak in sod., 1991; Hebsgaard in sod., 1996). Z omenjenim orodjem smo preverili, kje se nahajajo mesta izrezovanja pri WT genu *TARDBP* in v primeru nukleotidne zamenjave c.990A>G. NetGene2 v primeru omenjene nukleotidne zamenjave predvideva nastanek dveh novih mest za izrezovanje. Ker pa so

verjetnosti za tak način izrezovanja glede na rezultate orodja NetGene2 nižje kot pri WT, obenem pa se primarno prepoznavno zaporedje ohrani, zaradi nukleotidne zamenjave c.990A>G do sprememb v izrezovanju najverjetneje ne pride. V skladu z našimi predvidevanji je tudi fenotip našega bolnika s spremembama p.Gly93Cys v genu *SOD1* in c.990A>G v genu *TARDBP*, ki je popolnoma primerljiv z dodobra ovrednotenimi kliničnimi značilnostmi na vzorcu 20 bolnikov z dedno obliko ALS s prisotno mutacijo p.Gly93Cys v genu *SOD1* (Regal in sod., 2006).

V genu *FUS* smo pri enem bolniku našli že opisano nukleotidno spremembo c.1566G>A (Ticozzi in sod., 2009). Ker so to spremembo našli tudi pri zdravih posameznikih, poleg tega pa niso našli nobenih razlik v izražanju mRNA ali količini proteina med bolniki, ki imajo to spremembo in tistimi, ki je nimajo (Corrado in sod., 2010), te spremembe ne pojmujemo kot razlog za bolezen.

Kot najpogostejši genetski vzrok sporadične bolezni ALS smo zaznali razširitve heksanukleotidnih ponovitev v 1. intronu gena *C9ORF72* (HREM), in sicer pri 5 od 85 bolnikov, kar znaša 5,9 %, o enakem deležu (6 %) poročajo tudi Smith in sod. (2013). Naši izsledki sovpadajo z rezultati študije na vzorcih evropske populacije, ki poroča o najvišjem odstotku (8 %) pri prebivalcih Severne Evrope, nato pa odstotek vpletenosti omenjene spremembe v genu *C9ORF72* kot vzroku za bolezen pada proti jugu Evrope, kjer znaša le še 4,7 % (Fogh in sod., 2014). V Severni Italiji je vzrok za sporadično obliko bolezni ALS v genu *C9ORF72* pri 5 % bolnikov (Ratti in sod., 2012; Bertolin in sod., 2014), na Sardiniji, ki predstavlja izolirano populacijo, pa višjo, in sicer 6,5 % (Borghero in sod., 2014).

Pri bolnikih z zaznano spremembo v genu *C9ORF72* naj bi bila oblika bolezni pogostejše bulbarna kot spinalna (40 %) v primerjavi s preostalimi bolniki, kjer se bulbarna oblika pojavi pri 25 % (Chio in sod., 2012). Na populaciji slovenskih bolnikov teh razlik nismo zaznali; 20 % bolnikov s spremembo v genu *C9ORF72* in 25 % preostalih bolnikov ima bulbarno obliko ALS. Vzrok za ta odstopanja bi lahko bil relativno majhen vzorec bolnikov, pri katerih smo izvajali analize. Prisotnost spremembe v genu *C9ORF72* pri naših bolnikih ni vplivala na starost ob pojavu bolezni ALS, je pa zmanjšala dobo preživetja na 1,2 leta ( $p < 0,0001$ ) in hkraten pojav bolezni FTD (en bolnik z mutacijo v genu *C9ORF72* tudi pridruženo bolezen FTD), kar je skladno z ugotovitvami študij Cooper-Knock in sod. (2012) in Byrne in sod. (2012).

Mehanizem razvoja bolezni pri bolnikih z mutacijo v genu *C9ORF72* ni popolnoma pojasnjen. Nevrodegeneracija naj bi bila posledica nastanka toksičnega produkta, ali pa protein zaradi mutacije izgubi svojo funkcijo. Delna haploinsuficienca bi lahko bila vzrok, saj naj bi intronske razširitve povzročile izgubo enega ali vseh alternativno izrezanih transkriptov *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez in sod., 2011; Renton in sod., 2011). Nastajanje RNA vključkov znotraj celičnega jedra (RNA toksičnost) pa nakazuje, da zaradi te mutacije prihaja do napake pri izrezovanju intronov (Cooper-Knock in sod., 2012).

Zanimiva je ugotovitev, da nastajata dva tipa RNA vključkov, nekateri se prepišejo v smerni (angl. sense), drugi pa v protismerni (angl. antisense) orientaciji. Na podlagi tega so razvili protismerne oligonukleotide (angl. antisense oligonucleotide, ASO), ki ciljano delujejo na RNA vključke v smerni orientaciji brez vpliva na izražanje gena *C9ORF72* (Bennett in Swayze, 2010; Lagier-Tourenne in sod., 2013). V drugi študiji so na pluripotentnih zarodnih celicah bolnikov z ALS, ki so jih diferencirali v nevronske celice, uspeli ublažiti posledice bolezni ALS z omenjeno protismerno terapijo (Donnelly in sod., 2013). Izsledki obeh študij potrjujejo vpletenost mehanizma o pridobitvi toksične funkcije RNA zaradi mutacije v *C9ORF72* v nastanek bolezni ALS, rezultati pa nakazujejo, da bi se takšen pristop lahko izkazal kot učinkovita ciljana terapija pri bolnikih z mutacijo v genu *C9ORF72*.

Rezultati naše raziskave kažejo, da so mutacije v genih *SOD1*, *FUS* in *TARDBP* le redko vzrok za sporadično obliko bolezni, kar je v skladu z do sedaj izvedenimi študijami (Chio in sod., 2008; Guerreiro in sod., 2008; Lai in sod., 2011). Prav tako pa se z omenjenimi raziskavami skladajo tudi naše ugotovitve glede pogostosti posameznih mutacij, in sicer v genu *SOD1* je bila ugotovljena frekvenca 2,3 %, v genih *TARDBP* in *FUS* pa v vsakem po 1,2 %. Gre za prvo tovrstno raziskavo najpogostejših v ALS vpletenih genov v slovenski populaciji. Skupno smo tako ugotovili 9 sprememb pri 8-ih bolnikih z ALS in pri 8,2 % bolnikov našli genetski vzrok za bolezen. Tovrstne študije določevanja mutacij pri bolnikih z ALS so pomembne predvsem z vidika razvoja ciljanih terapij v prihodnosti, saj bo pomembna vsaka informacija. V tej smeri, kot je že zgoraj omenjeno, veliko obeta gen *C9ORF72*, v fazi kliničnih poskusov pa je tudi že protismerna terapija pri bolnikih z ALS, ki imajo prisotne mutacije v genu *SOD1* (Smith in sod., 2006b; Miller in sod., 2013).

## 5.2 METILIRANOST GENOV PRI SLOVENSKIH BOLNIKI Z ALS

Metilacija citozinov je kovalentna modifikacija DNA, ki vpliva na vezavo transkripcijskega faktorja. Utišanje gena pa lahko poteka tudi posredno s proteinsko domeno MBD (angl. methyl-CpG binding domain), ki povzroči spremembe v strukturi kromatina (Klose in Bird, 2006). Ob tem vedenju je jasno, da je stopnja utišanja gena lahko različna in odvisna od gostote CpG-jev v promotorju. Nekatere študije celo trdijo, da metiliranost promotorjev z visoko gostoto CpG-jev (HCP promotorji) ni nujno povezana z utišanjem gena, manj pa je znanega o povezavi metiliranosti promotorja z izražanjem gena za promotorje z nizko gostoto CpG-jev (LCP promotorji) (Boyes in Bird, 1992; Hsieh, 1994).

Rezultati metilacijskega profiliranja celotnega genoma so nam omogočili vpogled v raznolikost metilacijskega statusa promotorjev med vzorci, in sicer smo za vsak preiskani vzorec in tip promotorja izvedeli, katerih 200 genov je bilo v promotorju hipermetiliranih. Analiza je bila izvedena na 4-ih vzorcih bolnikov z ALS, od katerih sta 2 imela potrjeno

mutacijo v genu *C9ORF72*, pri dveh pa nismo našli mutacije v nobenem od preiskovanih genov. Glede na te podatke smo pričakovali bolj enoten metilacijski profil med vzorci, predvsem pa smo upali na morebitne razlike v metiliranosti promotorjev med vzorcema z mutacijo v genu *C9ORF72* in vzorcema brez najdene mutacije. Ta kriterij smo poleg drugih tudi upoštevali pri izboru genov za nadaljnje raziskave. Problem analiz, kot je tudi metilacijsko profiliranje celotnega genoma z metodo HiSeq, je namreč ogromna količina podatkov, ki zahtevajo dobro bioinformatiko analizo. Rezultati takšnih analiz tudi ne izključujejo sprememb v vzorcu metilacije, ki se normalno pojavlja s staranjem (Hernandez in sod., 2011), prav tako pa nimamo podatka, kakšen je normalni status promotorja določenega gena. Literatura je s takšnimi podatki zaenkrat še dokaj skopa, malo raziskav je bilo narejenih na področju metilacije, je pa tudi res, da je število genov, ki bi lahko bili vpleteni v številne bolezenske procese, ogromno. Poleg tega metode nove generacije sekvenciranja zaradi še vedno dokaj visokih cen nam niso dostopne za analize večjega števila vzorcev. Vprašljiva je tudi specifičnost, zato je validacija rezultatov na večjem številu vzorcev skoraj nujna. Mi smo kot ustrezno metodo izbrali metilacijsko specifično analizo talilne krivulje pri visoki ločljivosti (MS-HRM), ki jo odlikujeta prav visoka specifičnost in občutljivost in je tako ustrezna za zaznavanje metiliranih CpG dinukleotidov v promotorjih izbranih genov (Wojdacz in Dobrovic, 2007). Z njo smo preverili metiliranost promotorjev 14-ih genov, ki so se nam glede na njihovo funkcijo ali morebitno vpletenost v procese nevrodegeneracije in apoptoze zdeli zanimivi za nadaljnje raziskave (skupaj z razlogom za izbiro so navedeni v Preglednica 11). Promotorji HCP so večinoma nemetilirani celo takrat, ko se ne izražajo (Bird 2002), medtem ko so promotorji LCP pogosto metilirani, vendar ne nujno tudi utišani. Promotorji ICP ne spadajo ne v eno, ne v drugo skupino glede na tip promotorja, lahko so metilirani ali nemetilirani in zato tvorijo svojo skupino (Weber in sod., 2007). Takšnih je med našimi izbranimi geni 5, in sicer so to geni *NRTN*, *NTF3*, *TP73*, *FRG1* in *MAB21L2*. Takšni s promotorji HCP so 3-je, *PTK6*, *KIR2DS4* in *PYCR1*, medtem ko so v skupini LCP geni *TERT*, *TFDP1*, *AGAP2* in *KCNJ14*. Gena *PRKCZ* in *DUX4* pa se glede na rezultate metilacijskega profiliranja celotnega genoma uvrščata v kar dve skupini, in sicer v HCP in LCP.

*DUX4* je normalno utišan v večini tkiv (Dandapat in sod., 2014), pri bolezni FSHD pa so dokazali njegovo izražanje (Yao in sod., 2014) in tudi hipometilacijo pri bolnikih s FSHD, pri zdravih posameznikih pa je bil gen *DUX4* hipermetiliran (Jones in sod., 2014). Ugotovili so tudi, da *DUX4* spodbudi izražanje gena *FRG1*, tako da gre za skupno vpletenost obeh genov v pojav bolezni FSHD (Ferri in sod., 2015). Promotor gena *DUX4* je bil pri naših vzorcih z ALS metiliran, promotor gena *FRG1* pa nemetiliran, kar kaže na to, da pri bolezni ALS in FSHD verjetno ni skupnih molekularnih mehanizmov.

Promotorja genov *KIR2DS4* in *AGAP2* sta bila metilirana pri bolnikih z ALS z vsemi tremi metodami, z metilacijskim profiliranjem ter MS-HRM in sekvenciranjem po Sangerju. Pri genu *KIR2DS4* so dokazali hipometilacijo pri bolnikih, ki so imeli transplantacijo hematopoetskih celic (Gallez-Hawkins in sod., 2012), pri genu *AGAP2* pa so v

promotorskih regijah zaznali hipometiliranost pri raku trebušne slinavke (Zhao in sod., 2014). Prav tako smo z vsemi tremi uporabljenimi metodami zaznali hipermetiliranost promotorjev genov *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* in *MAB21L2* in *TERT*. Metiliranost promotorja gena *TERT* je povezana z možganskimi tumorji pri otrocih (Castelo-Branco in sod., 2013), medtem, ko za gene *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* in *MAB21L2* v literaturi nismo našli podatkov o metilacijskem statusu njihovih promotorjev. Čeprav smo v povezavi z ALS prvič v okviru te naloge določili hipermetiliranost promotorjev navedenih genov, pa ne moremo trditi, da je tak vzorec metilacije vzrok ali posledica bolezni ALS. Z metodama MS-HRM in sekvenciranjem po Sangerju so se preiskovani odseki omenjenih 5-ih genov izkazali za hipermetilirane tudi pri vzorcu zdravih odraslih oseb (povprečna starost je 48 let), ki smo jih uporabili kot kontrolo.

Pri bolnikih z ALS so hipermetiliranost genoma v vzorcih krvi že zaznali in tudi dokazali, da se pojavlja neodvisno od starosti bolnikov (Tremolizzo in sod., 2014). Na drugi strani pa v promotorjih genov *PRKCZ*, *PTK6*, *TFDP1*, *NTF3*, *TP73* in *FRG1* z metodo MS-HRM nismo zaznali metiliranosti CpG dinukleotidov in tako nismo potrdili rezultatov pridobljenih z metodo HiSeq. Hipermetilacijo gena *PRKCZ* so povezali z diabetesom tipa 2 (Zou in sod., 2013), hipermetilacijo gena *PTK6* z rakom na jajčnikih (Yu in sod., 2011), prekomerno izražanje gena *TFDP1* pa z rakom na prsih (Moscovich in sod., 2013). Gen *NTF3* je pogosto hipermetiliran v povezavi z moško neplodnostjo (Rajender in sod., 2011), hipermetilacijo gena *TP73* pa so zaznali na vzorcih možganov oligodendrogličnih tumorjev (Dong in sod., 2002). Ker so ti geni običajno nemetilirani, so bili rezultati metilacijskega profiliranja toliko bolj zanimivi za validacijo, vendar pa jih z metodo MS-HRM nismo potrdili, s sekvenciranjem po Sangerju pa smo dobili potrditev o točnosti in zanesljivosti rezultatov metode MS-HRM. Treba pa je poudariti, da ima tudi metoda MS-HRM določene zahteve, ki smo jih morali upoštevati. Gre za natančno metodo, pri kateri je izrednega pomena dolžina produkta PCR. Začetne oligonukleotide smo kreirali tako, da so pomnoževali relativno kratek del zaporedja bisulfitno pretvorjene DNA, saj smo s tem povečali občutljivost zaznave v razliki fluorescence. Ta namreč pokaže razliko med talilnima temperaturama preiskovanih vzorcev. Večje, kot je število GC parov, pri višji temperaturi (melting temperature,  $T_m$ ) se bo dvoverižna DNA razklenila (Dahl in Guldborg, 2007). Zato smo morali pri kreiranju začetnih oligonukleotidov poleg ostalih zahtev (Li in Dahiya, 2002) omejiti še dolžino produkta PCR. Z enim parom začetnih oligonukleotidov smo pokrili le nekaj CpG dinukleotidov, ne pa celotnega CpG otočka.

Izsledki naše študije so pomembni za nadaljnje raziskave na področju metilacije, kjer mnoga vprašanja še vedno niso dobila odgovora. Področje je izredno široko, vendar pa je hkrati po našem mnenju tudi dovolj obetavno, da bi nadaljnje raziskave lahko doprinesle k napredku v razumevanju poteka bolezni ALS in njenih mehanizmov. Čeprav je jasno, da imajo spremembe v metilaciji vlogo tudi pri nevrodegenerativnih boleznih, še vedno ne vemo, kateri mehanizmi v te spremembe vodijo. Lahko bi bile spremembe v metilaciji tudi odgovor organizma na nevrodegeneracijo, torej ne vzrok, ampak posledica.

### 5.3 PROFIL IZRAŽANJA miRNA PRI BOLNIKI Z ALS

Po predvidevanjih naj bi se pri človeku izražalo vsaj tisoč različnih miRNA, bioinformatične analize pa kažejo, da naj bi miRNA sodelovale pri uravnavanju približno 30 % genov (Lewis in sod., 2005). Funkcijske študije potrjujejo, da miRNA sodelujejo pri praktično vseh preiskovanih celičnih procesih in da so spremembe v njihovem izražanju tesno povezane z nastankom bolezni (Filipowicz in sod., 2008).

V okviru te naloge smo ugotavljali diferencialno izražanje miR-9, miR-338, miR-638, miR-663a, miR-124a, miR-143, miR-451a, miR-132, miR-206 in let-7b. Od naštetih miRNA, izražanje miR-9, miR-663a in miR-124a v krvnih celicah bolnikov z ALS do sedaj še ni bilo preiskovano. V naši raziskavi smo tako izražanje miRNA v levkocitih poleg omenjenih treh miRNA prvič zaznavali tudi pri miR-143, let-7b, miR-132 in miR-206, ki so sicer bile že analizirane v serumu bolnikov. Raziskave na področju izražanja miRNA v krvnih celicah bolnikov z ALS pripomorejo k razumevanju patogeneze bolezni ALS in k odkrivanju novih biomarkerjev. Na krvnih vzorcih je znanje še posebno dobrodošlo zaradi dostopnosti in neinvazivnosti odvzema biološkega materiala tekom življenja bolnika, v nasprotju z neetičnimi in zato nedostopnimi biopsijami možganov in hrbtenjače.

#### 5.3.1 Izražanje miR-9, miR-338 in miR-638 ter njihovih gostiteljskih genov *C1ORF61*, *AATK* in *DNM2*

Večina miRNA pri človeku leži v intergenskih regijah, približno tretjina pa se nahaja v intronih t.i. gostiteljskih genov (intragenske miRNA). Te so večinoma v isti orientaciji kot njen gostiteljski gen in zato najpogosteje tudi pod vplivom promotorja gostiteljskega gena (Baskerville in Bartel, 2005). Tri od 10-ih, v tej študiji analiziranih miRNA, so bile intragenske, dve (miR-638 in miR-338) imata enako orientacijo kot njuna gostiteljska gena (*DNM2* in *AATK*), 1 pa nasprotno (miR-9; gen *C1ORF61*). Tako sklepamo, da je razlog za izražanje miR-9 in hkratno neizražanje njenega gostiteljskega gena *C1ORF61* prav v nasprotni orientaciji. Gen *C1ORF61* je sicer vključen v razvoj možganov pri miškah, verjetno pa sodeluje tudi pri razvoju živčnega sistema (Jeffrey in sod., 2000). MiR-9 je močno izražena v živčnem sistemu (Lagos-Quintana in sod., 2002) in je pomemben dejavnik v uravnavanju nevrogeneze. Njena vloga je uravnavanje rasti aksonov preko regulacije translacije mRNA proteina MAP1B (Dajas-Bailador in sod., 2012). Sprememba ekspresije miR-9 tekom razvoja motoričnih nevronov vodi do spremenjenega podtipa motoričnega nevrona v piščančjih zarodkih (Otaegi in sod., 2011b). V tem modelu miR-9 posredno vpliva na razvoj in diferenciacijo nevronov v hrbtenjači (Otaegi in sod., 2011a). V hrbtenjači transgenih mišk z mutacijo p.Gly93Ala v genu *SOD1* so ugotovili zvišano izražanje te miRNA (Zhou in sod., 2013). Pri preiskovanih vzorcih slovenskih bolnikov z

ALS pa je bila miR-9 pri 55-ih vzorcih slovenskih bolnikov z ALS znižano izražena, pri ostalih 29-ih pa zvišano izražena.

MiR-338 se je znižano izražala z izjemo 10-ih vzorcev. Njen gostiteljski gen *AATK* (angl. apoptosis-associated tyrosin kinase) pa se je znižano izražal pri vseh vzorcih, torej tudi pri tistih 10-ih vzorcih, kjer se je miR-338 zvišano izražala. V študiji Gokey in sod. (2012) so znotraj gena *AATK* našli alternativni promotor, ki se nahaja malo nižje od vezavnega mesta transkripcijskega faktorja SOX10. Ta vpliva na izražanje več miRNA, vključno z miR-338. Ugotovili so, da so krajši transkripti, ki vključujejo tudi miR-338, odvisni od SOX10, medtem ko je celoten transkript gena *AATK* neodvisen od transkripcijskega faktorja SOX10. Izsledki te študije nakazujejo, da izražanje miR-338 uravnava tudi alternativni promotor. V nasprotju z našimi rezultati so druge študije odkrile zvišano izražanje miR-338 tako v možganskem tkivu (Shioya in sod., 2010), kot tudi v levkocitih, serumu in hrbtenjači (De Felice in sod., 2014) 72-ih bolnikov s sporadično obliko ALS. Po drugi strani pa v študiji, v kateri so spremljali spremembe v izražanju miR-338 in njenega gostiteljskega gena *AATK* med potekom zorenja hipokampalnih nevronov pri podganah, niso našli korelacije v izražanju miR-338 in gena *AATK*. Analiza določevanja zaporedja neprevedljivih regij (angl. untranslated regions, UTR) mRNA gena *AATK* je razkrila prisotnost dveh domnevnih vezavnih mest za miR-338. Zato avtorji sklepajo, da miR-338 lahko vpliva na raven mRNA gena *AATK* v nevronih. Gen *AATK* ima pomembno vlogo pri diferenciaciji, apoptozi in potencialno tudi pri nevrodegeneraciji (Kos in sod., 2012). Analiza metilacijskega statusa promotorja gena *AATK* je v naši študiji pokazala, da bi zmanjšano izražanje omenjenega gena lahko bilo posledica metiliranosti promotorja.

Edina miRNA, pri kateri smo kljub njenemu zvišanemu izražanju pri vseh vzorcih preverili izražanje gostiteljskega gena, je intragenska miR-638. Izkazalo se je, da je gen *DNM2* (angl. dynamin 2), ki je njen gostiteljski gen, obratno izražen kot miR-638; pri vseh vzorcih se je znižano izražal. Najverjetnejši razlog za njuno obratno izražanje je, da se miR-638 in njen gostiteljski gen *DNM2* ne prepisujeta iz istega promotorja kljub temu, da je miRNA zapisana znotraj gena. Torej se v tem primeru, ko je gen znižano izražen, iz introna prepiše le miRNA, gen pa ne, ker imata različen promotor in s tem začetek transkripcije (Kim in Kim, 2007; Ying in sod., 2008). Lahko pa na uravnavanje izražanja gena *DNM2* vpliva še kakšna druga miRNA. Predikcijsko orodje TargetScan ta gen namreč predvideva kot tarčo tudi za miR-301 in in miR-130. V nasprotju z našimi rezultati sta dve študiji našli znižano izraženo miR-638 v serumu pri bolnikih z dedno obliko ALS (Freischmidt in sod., 2014) in tudi v levkocitih bolnikov s sporadično obliko bolezni (De Felice in sod., 2012). Znižano izražanje gena *DNM2* bi lahko imelo vpliv na patogenezo bolezni ALS. *DNM2* je namreč povezan s kar dvema boleznima, Charcot-Marie Tooth nevropatijo in centronuklearno miopatijo. Avtorji ene ozmed študij so ugotovili, da izguba funkcije gena *DNM2* v skeletnih mišicah mišk sproži verigo škodljivih vzporednih in zaporednih dogodkov, med drugim v takšnih mišicah prihaja do poškodb mitohondrijev, nepravilnih povezav med mišico in živcem ter do propadanja perifernih živcev.

Spreminjajo se tudi mišična vlakna, hkrati pa prihaja tudi do izgubljanja mišične mase (Tinelli in sod., 2013). Vsi ti simptomi pa so značilni tudi za bolezen ALS. Zanimivo je tudi dejstvo, da si bolezeni Charcot-Marie Tooth nevropatija in ALS že delita mutacije v enem skupnem genu, in sicer gre za gen *FIG4* (Bird, 1993).

### 5.3.2 Izražanje miR-663a in miR-124a ter miR-143 in miR-451a

Zapisi za intergenske miRNA se nahajajo samostojno, predvidoma neodvisno od drugih genov. Takšne so miR-663a, miR-124a, miR-143 in miR-451a. Pri dveh miRNA, miR-663a in miR-124a, smo v promotorjih našli CpG otoček, kar nam je omogočilo preverjanje, ali je metiliranost njunega promotorja morda vzrok za znižano izražanje omenjenih miRNA. MiR-124a se je znižano izražala pri vseh analiziranih bolnikih, medtem ko smo pri miR-663a zaznali pri nekaterih zvišano, pri drugih pa znižano izražanje. V študiji Buratti in sod. (2010) so dokazali zvišano izražanje miR-663a, vendar so rezultati temeljili na celičnih kulturah z utišanim genom *TARDBP*. Izražanje miR-124a je znižano v hrbtenjači mišk z mutacijo p.Gly93Ala v genu *SOD1* (Morel in sod., 2013). Promotorja obeh miRNA, miR-663a in miR-124a, sta se v naši raziskavi izkazala kot nemetilirana, iz česar sklepamo, da metiliranost promotorja ni razlog za znižano izražanje miR-663a in miR-124a, ampak na njuno izraženost vplivajo drugi mehanizmi.

Z mikromrežami so Felice in sod. (2012) preverjali izražanje miRNA v vzorcih levkocitov bolnikov z ALS. Med drugim so dokazali znižano izražanje miR-451a, s čimer sovpadajo rezultati naše raziskave. Omenjena miRNA se je znižano izražala pri 73-ih bolnikih od skupno 84 analiziranih. Poleg miR-451a bi bila za nadaljnje raziskave zanimiva tudi miR-143, ki se je pri vseh vzorcih z izjemo enega, znižano izražala. Vendar pa niti miR-451a, niti miR-143 v svojih promotorjih nimata prisotnih CpG otočkov, kar kaže na dejstvo, da morajo biti poleg metilacije v znižano izražanje nekaterih miRNA vpleteni tudi drugi mehanizmi. En izmed verjetnih je mehanizem ceRNA (angl. competing endogenous RNA). CeRNA so prepisi RNA, ki vsebujejo miRNA odzivne elemente, na katere vežejo miRNA in tako posredno zmanjšajo njihovo količino (Salmena in sod., 2011).

Statistično različno izražanje glede na spol se je pokazalo pri miR-143, in sicer se miR-143 statistično značilno manj izraža pri moških kot pri ženskah. Znižano izražanje miR-143 so že zaznali v serumu bolnikov s sporadično obliko bolezni (Freischmidt in sod., 2013), vendar pa ne poročajo o kakšnih razlikah v izražanju med spoloma. Do te razlike bi lahko prišlo, če bi bilo uravnavanje izražanja miR-143 pod vplivom hormonov, tako kot je naprimer izražanje miR-122 pod vplivom testosterona (Delic in sod., 2010), prav tako pa tudi mišično specifične miR-1 (Stauffer in sod., 2011) in miR-133a/b (Nielsen in sod., 2013).

### 5.3.3 Izražanje let-7b, miR-132 in miR-206

Let-7b, miR-132 in miR-206 so pokazale zvišano izražanje v vzorcih bolnikov z ALS z izjemo 5-ih vzorcev z znižanim izražanjem pri let-7b in 1 vzorca pri miR-132. Vse tri miRNA so intergenske, v svojih promotorjih pa nimajo prisotnih CpG otočkov.

Za razumevanje patogeneze pri bolezni ALS bi bilo potrebno poznati signaliziranje, ki poteka med vlakni skeletne mišice in motoričnimi nevroni. Prav v to signaliziranje je vpletena mišično-specifična miR-206, za katero so zvišano izražanje dokazali na mišjem modelu ALS, njeno pomanjkanje pa naj bi tudi pospešilo napredovanje bolezni (Williams in sod., 2009). Zvišano izražanje miR-206 pri ljudeh so pokazali tudi Russell in sod. v vzorcih skeletnih mišic (2013) ter Toivonen in sod. v serumu (2014). V serumu otrok z Duchennovo mišično distrofijo so prav tako dokazali zvišano izražanje miR-206 (Hu in sod., 2014). Pri naših bolnikih smo zvišano izražanje miR-206 dokazali v krvnih celicah (v levkocitih) pri vseh vzorcih, poleg tega pa je bila miR-206 tudi najmočnejše izražena od vseh analiziranih miRNA. Izsledki vseh teh študij nakazujejo, da bi miR-206 lahko bila potencialni neinvazivni biomarker. Zastavlja pa se tudi vprašanje, ali je zvišano izražanje miRNA posledica bolezni ali njen vzrok, oziroma kje v sosledju dogodkov se pojavljajo spremembe v izražanju te miRNA.

Rezultati izražanja miR-132 so v skladu z ugotovitvami študije, v kateri so pokazali zvišano izražanje miR-132 v možganih podgan (Lungu in sod., 2013). MiR-132 posredno z vplivom na tarčne gene kot je acetilholinesteraza in TAU protein vpliva na morfologijo nevronov in njihovo rast (Smith in sod., 2011). Ta miRNA naj bi se tudi močno izražala v nevronih in bi zato lahko imela pomembno vlogo pri nevrodegenerativnih boleznih. Na drugi strani pa Freischmidt in sod. (2013) poročajo o znižanem izražanju miR-132 v serumu bolnikov s sporadično obliko ALS. Poročajo o prav tako znižanem izražanju let-7b v serumu, kar je v nasprotju z našimi rezultati, saj je bila tudi ta miRNA zvišano izražena pri praktično vseh slovenskih bolnikih. Omenjene razlike v izražanju so lahko posledica različnega izhodnega biološkega materiala. Naše analize izražanja so bile izvedene na miRNA, izolirane iz levkocitov. Tu zaznavamo miRNA, ki se izražajo ob vnetnih procesih in imunskem odgovoru. Pri izolaciji miRNA iz seruma pa se izolirajo tudi miRNA, ki se v kri sproščajo iz apoptotičnega ali nekrotičnega tkiva ter miRNA, ki se iz lizirajočih celic ob koagulaciji sprostijo v kri. Gre torej tudi za izvencelične miRNA in tiste, ki jih celice v telesu sproščajo v krvni obtok (Wang in sod., 2012).

V prihodnje bi bilo na področju bolezni ALS potrebno izvesti še mnoge raziskave. Še vedno ostaja pomembno področje ugotavljanje novih mutacij predvsem zaradi razvoja ciljane terapije glede na okvarjeni gen. Pomembno bi bilo najti tudi morebitne asimptomatske prenašalce mutacij, ki bi morda lahko razložili nekatere primere, ki jih sedaj vrednotimo kot sporadične. Ker je ALS bolezen, ki se pojavi v pozni odrasli dobi, bi veljalo terapijo pri diagnosticiranih primerih uvajati še pred pojavom simptomov bolezni.

Da pa bi bilo vse to izvedljivo, moramo še mnogo bolje razumeti patogenezo in razvoj oziroma napredovanje bolezni ter mehanizme, ki so vključeni v njen nastanek. Poudarek raziskav je tako tudi na *in vitro* študijah in pa na funkcijskih študijah. Ogromno je še neraziskanega in nejasnega v povezavi s to boleznijo, zato je bistvenega pomena iskanje novih pristopov na čim večjem številu vzorcev. Pomembno se nam zdi tudi, da se posveča raziskavam na krvi, saj ta zaradi neinvazivnosti predstavlja najustreznejši biološki material tako za raziskave, kot tudi za diagnostiko bolezni ALS v prihodnosti.

## 6 SKLEPI

- Z metodo sekvenciranja smo pri 85 bolnikih z ALS v genu *SOD1* našli 2 že opisani mutaciji, p.Val14Met in p.Gly93Cys. Pri bolnici z mutacijo p.Gly93Cys smo v genu *TARDBP* zaznali tudi novo nukleotidno spremembo c.990A>G, ki ne spremeni aminokisline (p.Leu330Leu) in jo opisujemo v svoji publikaciji. Še eno sinonimno zamenjavo c.1566G>A smo ugotovili v genu *FUS*, ki pa glede na raziskave ni vzrok za bolezen ALS;
- skupno smo odkrili 9 sprememb pri 8-ih bolnikih in tako našli genetski vzrok pri 9,4 % bolnikih z ALS v slovenski populaciji
- spremembe v genih *SOD1* (2,3 %), *FUS* (1,2 %) in *TARDBP* (1,2 %) so zastopane v podobnem deležu kot pri ostalih raziskavah;
- razširitve heksanukleotidnih ponovitev v 1. intronu gena *C9ORF72* smo analizirali s kapilarno elektroforezo in omenjeno spremembo dokazali pri 5-ih bolnikih. HREM v genu *C9ORF72* je tako kot pri drugih študijah, najpogostejši genetski vzrok za ALS tudi pri slovenski populaciji (5,9 %).

S temi rezultati lahko potrdimo postavljeno hipotezo: *»Pogostost in razporeditev mutacij v genih SOD1, FUS, TARDBP in C9ORF72 se pri slovenskih bolnikih z ALS ne bo bistveno razlikovala od drugih evropskih populacij. Odkrili pa bomo kakšno novo spremembo, ki bo značilna za slovensko populacijo.«*

- Z metodo metilacijskega profiliranja celotnega genoma smo dobili informacijo o hipermetiliranosti promotorjev genov pri izbranih bolnikih z ALS. Na podlagi rezultatov smo izbrali 14 genov in jim določili metiliranost promotorja z metodo MS-HRM pri vseh v raziskavo vključenih bolnikih z ALS, rezultate pa potrdili z metodo sekvenciranja po Sangerju;
- zaznali smo hipermetiliranost promotorjev 8-ih genov, od teh za gene *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* in *MAB21L2* v literaturi nismo zasledili podatkov o njihovem metilacijskem statusu, smo pa pokazali hipermetiliranost preiskovanih odsekov tudi pri vzorcih zdravih odraslih. Tako sklepamo, da spremembe v metilaciji niso posledica bolezni ALS, ampak bi lahko bile povezane s staranjem;
- pri 6-ih genih pa metiliranosti njihovih promotorjev nismo potrdili.

Glede na dobljene rezultate lahko potrdimo naslednjo hipotezo: *»Odkrili bomo spremenjen metilacijski status nekaterih genov.«*

- Z analizo qPCR smo preverjali izražanje 10 miRNA, od katerih je le pri miR-338, miR-638 in miR-451a že bilo analizirano njihovo izražanje v vzorcih levkocitov bolnikov z ALS. Ugotovili smo spremenjeno izražanje teh miRNA pri bolnikih z ALS v primerjavi z zdravo populacijo, štiri miRNA so se zvišano izražale, dve znižano, štiri miRNA pa so pokazale različno izražanje;
- pri intragenski miR-338 z znižanim izražanjem smo dokazali tudi znižano izražanje njenega gostiteljskega gena *AATK*, kar bi lahko bila posledica metiliranosti promotorja omenjenega gena;
- preverili smo tudi izražanje gostiteljskega gena *DNM2* miR-638 s sicer zvišanim izražanjem in ugotovili, da je gen *DNM2* znižano izražen;
- miR-9 se je različno izražala v vzorcih bolnikov, njen gostiteljski gen *C1ORF61* pa se v krvnih celicah ni izražal;
- promotor miR-663a, ki se v vzorcih različno izraža, je nemetiliran;
- znižano izražanje miR-124a ni posledica metiliranosti njenega promotorja;
- miR-206 je bila najmočnejše izražena od vseh analiziranih miRNA.

Z navedenimi rezultati delno potrjujemo zadnjo hipotezo: *»Odkrili bomo spremenjeno izražanje nekaterih miRNA, ki so vključene v molekularne procese, povezane s propadanjem nevronov. Znižano izražanje bo posledica povečane metilacije promotorja gostiteljskega gena določene miRNA ali promotorja te miRNA.«*

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je huda nevrodegenerativna bolezen, ki se navadno pojavi v odrasli dobi s tipičnimi simptomi kot so mišična šibkost, atrofija in mišična paraliza. Smrt nastopi zaradi dihalne nezadostnosti v dveh do petih letih po pojavu simptomov. Ker gre za neozdravljivo bolezen, ki močno prizadane bolnika in njegovo okolico, so velikega pomena raziskave na področjih genetike in epigenetike v povezavi s kliničnimi izsledki. Rezultati študij, ki se v zadnjih letih izvajajo v velikem obsegu, nam bodo dali vpogled v to kompleksno bolezen, na pojav katere očitno vpliva več različnih dejavnikov. Njena patologija kljub intenzivnim raziskavam še vedno ni jasna in pri mnogih primerih ne poznajo vzroka.

V prvem delu doktorske naloge smo zbrali klinične podatke in se posvetili ugotavljanju sprememb v nukleotidnem zaporedju pri 4-ih, v ALS najpogostejše udeleženih genih, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72*. Analizo prvih treh genov smo izvedli z metodo sekvenciranja po Sangerju, pri genu *C9ORF72* pa gre za razširitev heksanukleotidnih ponovitev v 1. intronu gena, kar smo zaznavali z metodo kapilarne elektroforeze na vzorcih 85-ih bolnikov. V genu *SOD1* smo našli 2 že predhodno opisane mutacije, in sicer p.Val14Met in p.Gly93Cys. V genih *FUS* in *TARDBP* smo našli 2 sinonimni zamenjavi, 1 v genu *TARDBP* (c.990A>G, p.Leu330Leu) in 1 v genu *FUS* (c.1566G>A, p.Arg522Arg). Zamenjava v genu *TARDBP* predhodno še ni bila opisana in jo tako prvič opisujemo v okviru tega dela. Nukleotidno spremembo v genu *FUS* so našli tudi pri zdravih posameznikih in verjetno ni vpletena v pojav bolezni. Razširitve heksanukleotidnih ponovitev v prvem intronu gena *C9ORF72* smo ugotovili pri 5-ih bolnikih, ki tako v skladu z drugimi študijami predstavlja najpogostejši vzrok bolezni ALS tudi pri slovenskih bolnikih. Prisotnost spremembe v genu *C9ORF72* ni vplivala na starost ob pojavu bolezni ALS, je pa zmanjšala dobo preživetja in hkraten pojav bolezni FTD, kar je skladno z ugotovitvami drugih študij.

V drugem delu naše študije smo se posvetili raziskavam na področju metilacije. Predvsem nas je zanimal metilacijski status promotorjev genov. V ta namen smo 4 vzorce poslali na metilacijsko profiliranje celotnega genoma z novo generacijo sekvenciranja. Na podlagi dobljenih rezultatov smo 14 genov, katerih promotorji so bili hipermetilirani, izbrali za validacijo. Za vseh 14 genov smo v literaturi našli podatke o njihovi vpletenosti v procese nevrodegeneracije ali v mehanizme, ki bi lahko bili pomembni pri nastanku ALS. Rezultate metilacijskega profiliranja smo validirali na vseh 95-ih vzorcih bolnikov z metodo MS-HRM, rezultate pa potrdili tudi z metodo sekvenciranja po Sangerju. Metiliranost smo potrdili v izbranih preiskovanih odsekih v promotorjih genov *DUX4*, *AGAP2*, *KIR2DS4*, *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCR1*, *TERT* in *MAB21L2*, medtem ko pri genih *FRG1*, *PTK6*, *TFDP1*, *NTF3*, *TP73* in *PRKCZ* nismo zaznali metilacije. Za gene *KCNJ14*,

*NRTN*, *PYCRL* in *MAB21L2* v literaturi nismo našli podatkov o metilacijskem statusu njihovih promotorjev, vendar pa so se izkazali za hipermetilirane tudi v našem kontrolnem vzorcu zdravih odraslih oseb. Metoda MS-HRM je zelo natančna in občutljiva metoda, za učinkovito analizo pa zahteva relativno kratke pomnožke PCR, tako da smo z enim parom začetnih oligonukleotidov pomnožili in verificirali le del CpG otočka.

Zadnji del doktorske naloge smo namenili še enemu epigenetskemu mehanizmu z močnim vplivom na uravnavanje izražanja genov, miRNA. Diferencialno izražanje miRNA uravnava mnoge procese v človeškem telesu, spremembe v njihovem izražanju so tako zaznali pri mnogih boleznih, tudi pri raku in nevrodegenerativnih boleznih, vključno z ALS. Izbrali smo 10 miRNA, od katerih jih 7 še ni bilo analiziranih v vzorcih levkocitov bolnikov z ALS in z metodo qPCR preverjali njihovo izražanje. Pokazali smo zvišano izražanje let-7b, miR-132, miR-206 in miR-638, pri ostalih, z znižanim izražanjem, pa smo določali še možen vzrok znižanega izražanja. Tako smo v primeru intragenskih miRNA preverjali izražanje gostiteljskega gena. Izkazalo se je, da je gostiteljski gen *AATK* znižano izražen enako kot njegova miR-338, vendar pa smo znižano izražanje odkrili tudi pri 10-ih vzorcih, pri katerih je bila miR-338 zvišano izražena. Z metodo MS-HRM smo preverili tudi, ali je možen vzrok za znižano izražanje v metiliranosti promotorja gena *AATK* in ugotovili, da je promotor gena *AATK* metiliran. MiR-9 se je različno izražala v vzorcih bolnikov, njen gostiteljski gen *C1ORF61* pa se v krvnih celicah ne izraža. Preverili smo še izražanje gena *DNM2*, kljub temu, da je njegova miR-638 zvišano izražena, in zaznali znižano izražanje omenjenega gena. Nadalje nas je pri intergenskih miRNA z znižanim izražanjem zanimalo, ali je metilacija promotorja možen vzrok za njihovo znižano izražanje, kar smo ugotavljali z metodo MS-HRM. Preverili smo dve miRNA, miR-663a, ki se je različno izražala pri bolnikih z ALS in miR-124a z znižanim izražanjem. Pri nobeni nismo našli metiliranih promotorjev. MiR-143 in miR-451a sta se obe znižano izražali, vendar pa v njunih promotorjih ni prisotnih CpG otočkov. MiR-143 se je tudi statistično značilno manj izražala pri moških v primerjavi z ženskami.

Ta raziskava predstavlja prvo tovrstno študijo bolezni ALS pri slovenski populaciji in je kot takšna originalen prispevek k znanosti na področju te bolezni. Genetski vzrok za bolezen smo odkrili pri 8-ih bolnikih (9,4 %), najpogostejši vzrok je tudi v Sloveniji sprememba HREM v genu *C9ORF72* (5,9 %). Spremembe v genih *SOD1* (2,3 %), *FUS* (1,2 %) in *TARDBP* (1,2 %) pa tudi v slovenski populaciji predstavljajo redek vzrok za spradično obliko bolezni ALS. Določevali smo tudi metilacijski status promotorjev 14-ih genov, ki so se z metodo HiSeq izkazali za hipermetilirane. Pri 8-ih genih smo potrdili hipermetiliranost z metodama MS-HRM in s sekvenciranjem po Sangerju. Za 4 od teh genov, *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* in *MAB21L2*, v literaturi nismo zasledili raziskav na področju metiliranosti njihovih promotorjev, vendar pa so bili v naši raziskavi z metodama MS-HRM in sekvenciranjem po Sangerju hipermetilirani tudi pri kontrolnem vzorcu zdravih posameznikov. Določali smo tudi diferencialno izražanje 10 miRNA, ki so jih v predhodnih raziskavah nekatere detektirali v serumu, nekatere v levkocitih, nekatere v

*post-mortem* tkivu bolnikov z ALS, nekatere pa v mišjih modelih ALS. Sedem od desetih miRNA smo prvič v okviru te raziskave določili v krvnih vzorcih bolnikov. Posebno je zanimiva miR-206, saj smo njeno zvišano izražanje dokazali v levkocitih pri vseh vzorcih. MiR-206 je bila tudi najmočnejše izražena od vseh analiziranih miRNA. Njeno zvišano izražanje so dokazali na mišjem modelu ALS, v vzorcih skeletnih mišic in v serumu bolnikov. MiR-206 bi tako lahko bila potencialni genetski biomarker.

## 7.2 SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset fatal neurodegenerative disease which presents with symptoms like muscle weakness, atrophy and later on paralysis leading to death due to respiratory failure in 2-5 years from onset. Because of its disastrous effect on the patients and their families the research in the field of genetics and epigenetics together with clinical findings are of great importance. Findings from such studies will provide us with insight into this complex disease and will enhance understanding of ALS pathogenesis. The disease results from the interplay of many factors and despite intensive research in this area the cause in many cases remains unknown.

In the first part of our research clinical data from ALS patients were collected and screening for mutations in 4 with ALS the most often associated genes *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* and *C9ORF72* was performed. First three genes were analysed by Sanger sequencing, whereas hexanucleotide repeat expansions in the first intron of *C9ORF72* gene was detected using capillary electrophoresis in 85 ALS patients. In *SOD1* gene 2 mutations p.Val14Met in p.Gly93Cys were detected. Sequencing of *FUS* and *TARDBP* genes revealed 2 synonymous substitutions, 1 in *FUS* (c.1566G>A, p.Arg522Arg) and 1 in *TARDBP* (c.990A>G, p.Leu330Leu). The *TARDBP* substitution is novel variant described in our publication. Nucleotide change in *FUS* was also found in control samples in other studies and it is not considered a disease causing mutation. Hexanucleotide repeat expansion of *C9ORF72* was the most common detected disease causing change found in 5 ALS patients which is in concordance with other studies. Pathologic expansion did not affect the average age of onset in our cohort, but decreased survival and increased the appearance of FTD which is in concordance with other studies.

The second part of our study was focused on the field of DNA methylation. We were particularly interested in methylation status of gene promoters. Therefore 4 samples were analysed using whole genome methylation profiling by next generation sequencing. Based on the results of 14 genes associated with processes of neurodegeneration, apoptosis or involved in the disease pathways were chosen for validation using MS-HRM and the results were confirmed with Sanger sequencing. Hypermethylation of *DUX4*, *AGAP2*, *KIR2DS4*, *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL*, *TERT* and *MAB21L2* was detected in all samples, whereas in *FRG1*, *PTK6*, *TFDP1*, *NTF3*, *TP73* and *PRKCZ* genes methylation was absent

from amplified promoter sequence. To our knowledge there are no data available in the literature about methylation status for the *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* and *MAB21L2* genes, but our results show that those promoters are hypermethylated also in the samples of healthy adults. MS-HRM is accurate and highly specific method, but for proper analysis relatively short PCR products are required. Consequently, one pair of primers amplifies only a small part of CpG island.

In the last part of this study we focused on miRNA which regulate gene expression post-transcriptionally and are a part of many molecular pathways. Changes in miRNA expression pattern are associated with many diseases, such as neurodegeneration and cancer. Ten miRNA were chosen for qPCR analysis. Overexpression of let-7b, miR-132, miR-206 and miR-638 was detected. Our interest was focused on miRNA showing reduced expression. In case of intragenic miRNA the expression of its host gene was investigated. MiR-338 and its host gene *AATK* both showed reduced expression compared to healthy controls. The reduced expression of *AATK* gene was also found in samples with overexpressed miR-338. MS-HRM method was used to analyse if promoter methylation is the reason for reduced expression of *AATK* gene and the results confirmed promoter hypermethylation. MiR-9 was found to be differentially expressed across samples, but its host gene *C10RF61* does not express itself in blood. We were also interested in expression of *DNM2* gene although its miR-638 was found to be overexpressed. Expression of *DNM2* gene was reduced. We also evaluated if promoter methylation is the reason for reduced expression of intergenic miRNA. Two miRNAs were analysed; miR663a showed different expression across samples and miR-124a showed reduced expression in ALS patients. None was found to have methylated promoter region. MiR-143 and miR-451 both showed reduced expression, but no CpG islands were found in their promoters. MiR-143 was also found to have statistically significant lower expression in men compared to women.

This study represents the first such study of ALS in the Slovenian population and is as such, a unique contribution to science in the field of this disease. The genetic cause of the disease was detected in 8 patients (9.4 %), the most common cause in Slovenia is a HREM change in *C9ORF72* (5.9 %) gene. Changes in *SOD1* (2.3 %), *FUS* (1.2 %) and *TARDBP* (1.2 %) represent a rare cause of sporadic ALS also in the Slovenian population. Methylation status of the promoters of the 14 genes found hypermethylated by HiSeq method was determined by MS-HRM and Sanger sequencing. In the 8 genes hypermethylation was confirmed. For the *KCNJ14*, *NRTN*, *PYCRL* and *MAB21L2* there is no data about their methylation status in the literature, but our results show their hypermethylation also in samples of healthy adults by MS-HRM, as well as by Sanger sequencing. We also determined the differential expression of 10 miRNAs that were in some previous studies detected in the serum of some white cells, some of the post-mortem tissue of patients with ALS and some in mouse models of ALS. Seven out of ten miRNA were in the context of this research determined for the first time in blood samples of patients. Particularly interesting is miR-206, as we have demonstrated its elevated

expression in leukocytes in all samples. MiR-206 was the most strongly expressed of all analyzed miRNA. Its elevated expression has been demonstrated in a mouse model of ALS, in the samples of the skeletal muscle and in the serum of patients. MiR-206 could therefore be the potential genetic biomarker.

## 8 VIRI

- Aaltonen L.A., Peltomaki P., Leach F.S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.P., Jarvinen H., Powell S.M., Jen J., Hamilton S.R. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260: 812-816
- Akerblom M., Sachdeva R., Barde I., Verp S., Gentner B., Trono D., Jakobsson J. 2012. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *Journal of Neuroscience*, 32, 26: 8879-8889
- ALSoD. 2015. The Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Genetics Database. King's College, London, Velika Britanija.  
<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/> (30. maj 2015)
- Andersen P.M. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current Neurology and Neuroscience Report*, 6: 37-46
- Andersen P.M., Al-Chalabi A. 2011. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Reviews Neurology*, 7: 603-615
- Andersen P.M., Forsgren L., Binzer M., Nilsson P., Ala-Hurula V., Keranen M.L., Bergmark L., Saarinen A., Haltia T., Tarvainen I., Kinnunen E., Udd B., Marklund S.L. 1996. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain*, 119, 4: 1153-1172
- Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297
- Baskerville S., Bartel D.P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna*, 11: 241-247
- Bennett C.F., Swayze E.E. 2010. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50: 259-293
- Bertolin C., D'Ascenzo C., Querin G., Gaiani A., Boaretto F., Salvoro C., Vazza G., Angelini C., Cagnin A., Pegoraro E., Soraru G., Mostacciuolo M.L. 2014. Improving the knowledge of amyotrophic lateral sclerosis genetics: novel SOD1 and FUS variants. *Neurobiology of Aging*, 35: 1212-1217
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16: 6-21
- Bird T.D. 1993. Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 4. V: GeneReviews(R). Pagon R.A., Adam M.P., Ardinger H.H., Wallace S.E., Amemiya A., Bean L.J.H., Bird T.D., Fong C.T., Mefford H.C., Smith R.J.H., Stephens K. (eds). Seattle (WA), University of Washington, Seattle University of Washington,
- Bocci T., Pecori C., Giorli E., Briscese L., Tognazzi S., Caleo M., Sartucci F. 2011. Differential motor neuron impairment and axonal regeneration in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD-1 mutations: lessons from neurophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 9203-9215

- Borghero G., Pugliatti M., Marrosu F., Marrosu M.G., Murru M.R., Floris G., Cannas A., Parish L.D., Occhineri P., Cau T.B., Loi D., Ticca A., Traccis S., Manera U., Canosa A., Moglia C., Calvo A., Barberis M., Brunetti M., Pliner H.A., Renton A.E., Nalls M.A., Traynor B.J., Restagno G., Chiò A. 2014. Genetic architecture of ALS in Sardinia. *Neurobiology of Aging*, 35, 12: 2882.e7-2882.e12, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.012
- Boyes J., Bird A. 1992. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO Journal*, 11: 327-333
- Brunak S., Engelbrecht J., Knudsen S. 1991. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *Journal of Molecular Biology*, 220: 49-65
- Buratti E., Baralle F.E. 2009. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Advances in Genetics*, 66: 1-34
- Buratti E., De Conti L., Stuani C., Romano M., Baralle M., Baralle F. 2010. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS Journal*, 277: 2268-2281
- Byrne S., Walsh C., Lynch C., Bede P., Elamin M., Kenna K., McLaughlin R., Hardiman O. 2011. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 82: 623-627
- Byrne S., Elamin M., Bede P., Shatunov A., Walsh C., Corr B., Heverin M., Jordan N., Kenna K., Lynch C., McLaughlin R.L., Iyer P.M., O'Brien C., Phukan J., Wynne B., Bokde A.L., Bradley D.G., Pender N., Al-Chalabi A., Hardiman O. 2012. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology*, 11: 232-240
- Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M.Q., Krainer A.R. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Research*, 31: 3568-3571
- Castelo-Branco P., Choufani S., Mack S., Gallagher D., Zhang C., Lipman T., Zhukova N., Walker E.J., Martin D., Merino D., Wasserman J.D., Elizabeth C., Alon N., Zhang L., Hovestadt V., Kool M., Jones D.T., Zadeh G., Croul S., Hawkins C., Hitzler J., Wang J.C., Baruchel S., Dirks P.B., Malkin D., Pfister S., Taylor M.D., Weksberg R., Tabori U. 2013. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *The Lancet Oncology*, 14: 534-542
- Chen Y.Z., Bennett C.L., Huynh H.M., Blair I.P., Puls I., Irobi J., Dierick I., Abel A., Kennerson M.L., Rabin B.A., Nicholson G.A., Auer-Grumbach M., Wagner K., De Jonghe P., Griffin J.W., Fischbeck K.H., Timmerman V., Cornblath D.R., Chance P.F. 2004. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *The American Journal of Human Genetics*, 74: 1128-1135
- Chestnut B.A., Chang Q., Price A., Lesuisse C., Wong M., Martin L.J. 2011. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *The Journal of Neuroscience*, 31: 16619-16636

- Chio A., Logroscino G., Traynor B.J., Collins J., Simeone J.C., Goldstein L.A., White L.A. 2013. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, 41: 118-130
- Chio A., Traynor B.J., Lombardo F., Fimognari M., Calvo A., Ghiglione P., Mutani R., Restagno G. 2008. Prevalence of SOD1 mutations in the Italian ALS population. *Frontiers In Neurology*, 70: 533-537
- Chio A., Calvo A., Moglia C., Restagno G., Ossola I., Brunetti M., Montuschi A., Cistaro A., Ticca A., Traynor B.J., Schymick J.C., Mutani R., Marrosu M.G., Murru M.R., Borghero G. 2010 Amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal lobar dementia in 3 families with p.Ala382Thr TARDBP mutations. *Archives of Neurology*, 67: 1002-1009
- Chio A., Borghero G., Restagno G., Mora G., Drepper C., Traynor B.J., Sendtner M., Brunetti M., Ossola I., Calvo A., Pugliatti M., Sotgiu M.A., Murru M.R., Marrosu M.G., Marrosu F., Marinou K., Mandrioli J., Sola P., Caponnetto C., Mancardi G., Mandich P., La Bella V., Spataro R., Conte A., Monsurrò M.R., Tedeschi G., Pisano F., Bartolomei I., Salvi F., Lauria Pinter G., Simone I., Logroscino G., Gambardella A., Quattrone A., Lunetta C., Volanti P., Zollino M., Penco S., Battistini S., Renton A.E., Majounie E., Abramzon Y., Conforti F.L., Giannini F., Corbo M., Sabatelli M. 2012. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain*, 135: 784-793
- Chow C.Y., Landers J.E., Bergren S.K., Sapp P.C., Grant A.E., Jones J.M., Everett L., Lenk G.M., McKenna-Yasek D.M., Weisman L.S., Figlewicz D., Brown R.H., Meisler M.H. 2009. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *The American Journal of Human Genetics*, 84: 85-88
- Choy M.K., Movassagh M., Goh H.G., Bennett M.R., Down T.A., Foo R.S. 2010. Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*, 11: 519
- Colombrita C., Onesto E., Tiloca C., Ticozzi N., Silani V., Ratti A. 2011. RNA-binding proteins and RNA metabolism: a new scenario in the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 149: 83-99
- Conaco C., Otto S., Han J.J., Mandel G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *PNAS*, 103: 2422-2427
- Cooper-Knock J., Hewitt C., Highley J.R., Brockington A., Milano A., Man S., Martindale J., Hartley J., Walsh T., Gelsthorpe C., Baxter L., Forster G., Fox M., Bury J., Mok K., McDermott C.J., Traynor B.J., Kirby J., Wharton S.B., Ince P.G., Hardy J., Shaw P.J. 2012. Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain*, 135: 751-764
- Corrado L., Del Bo R., Castellotti B., Ratti A., Cereda C., Penco S., Sorarù G., Carlomagno Y., Ghezzi S., Pensato V., Colombrita C., Gagliardi S., Cozzi L., Orsetti V., Mancuso M., Siciliano G., Mazzini L., Comi G.P., Gellera C., Ceroni M.,

- D'Alfonso S., Silani V. 2010. Mutations of FUS gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 47: 190-194
- Cudkowicz M.E., McKenna-Yasek D., Sapp P.E., Chin W., Geller B., Hayden D.L., Schoenfeld D.A., Hosler B.A., Horvitz H.R., Brown R.H. 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 41: 210-221
- Cunningham F., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Billis K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Kähäri A.K., Keenan S., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Overduin B., Parker A., Patricio M., Perry E., Pignatelli M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Aken B.L., Birney E., Harrow J., Kinsella R., Muffato M., Ruffier M., Searle S.M.J., Spudich G., Trevanion S.J., Yates A., Zerbino D.R., Flicek P. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research*, 2015 43 Database issue:D662-D669 doi: 10.1093/nar/gku1010
- Da Cruz S., Cleveland D.W. 2011. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 21: 904-919
- Dahl C., Guldberg P. 2007. High-resolution melting for accurate assessment of DNA methylation. *Clinical Chemistry*, 53: 1877-1878
- Dajas-Bailador F., Bonev B., Garcez P., Stanley P., Guillemot F., Papalopulu N. 2012. microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nature Neuroscience*, 15: 697-699
- Dandapat A., Bosnakovski D., Hartweck L.M., Arpke R.W., Baltgalvis K.A., Vang D., Baik J., Darabi R., Perlingeiro R.C., Hamra F.K., Gupta K., Lowe D.A., Kyba M. 2014. Dominant lethal pathologies in male mice engineered to contain an X-linked DUX4 transgene. *Cell Reports*, 8: 1484-1496
- dbSNP. 2015. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. ZDA.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (30. maj 2015)
- De Felice B., Guida M., Coppola C., De Mieri G., Cotrufo R. 2012. A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, 508: 35-40
- De Felice B., Annunziata A., Fiorentino G., Borra M., Biffali E., Coppola C., Cotrufo R., Brettschneider J., Giordana M.L., Dalmay T., Wheeler G., D'Alessandro R. 2014. miR-338-3p is over-expressed in blood, CFS, serum and spinal cord from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurogenetics*, 15: 243-253
- DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M., Finch N.A., Flynn H., Adamson J., Kouri N., Wojtas A., Sengdy P., Hsiung G.Y., Karydas A., Seeley W.W., Josephs K.A., Coppola G., Geschwind D.H., Wszolek Z.K., Feldman H., Knopman D.S., Petersen R.C., Miller B.L., Dickson D.W., Boylan K.B., Graff-Radford N.R., Rademakers R.

2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72: 245-256
- Delic D., Grosser C., Dkhil M., Al-Quraishy S., Wunderlich F. 2010. Testosterone-induced upregulation of miRNAs in the female mouse liver. *Steroids*, 75: 998-1004
- Deng H.X., Tainer J.A., Mitsumoto H., Ohnishi A., He X., Hung W.Y., Zhao Y., Juneja T., Hentati A., Siddique T. 1995. Two novel SOD1 mutations in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 4: 1113-1116
- Deng H.X., Zhai H., Bigio E.H., Yan J., Fecto F., Ajroud K., Mishra M., Ajroud-Driss S., Heller S., Sufit R., Siddique N., Mugnaini E., Siddique T. 2010. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 67: 739-748
- Deng H.X., Chen W., Hong S.T., Boycott K.M., Gorrie G.H., Siddique N., Yang Y., Fecto F., Shi Y., Zhai H., Jiang H., Hirano M., Rampersaud E., Jansen G.H., Donkervoort S., Bigio E.H., Brooks B.R., Ajroud K., Sufit R.L., Haines J.L., Mugnaini E., Pericak-Vance M.A., Siddique T. 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477: 211-215
- Dong S., Pang J.C., Hu J., Zhou L.F., Ng H.K. 2002. Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *International Journal of Cancer*, 98: 370-375
- Donnelly C.J., Zhang P.W., Pham J.T., Haeusler A.R., Mistry N.A., Vidensky S., Daley E.L., Poth E.M., Hoover B., Fines D.M., Maragakis N., Tienari P.J., Petrucelli L., Traynor B.J., Wang J., Rigo F., Bennett C.F., Blackshaw S., Sattler R., Rothstein J.D. 2013. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*, 80: 415-428
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 457-463
- Elden A.C., Kim H.J., Hart M.P., Chen-Plotkin A.S., Johnson B.S., Fang X., Armakola M., Geser F., Greene R., Lu M.M., Padmanabhan A., Clay-Falcone D., McCluskey L., Elman L., Juhr D., Gruber P.J., Rüb U., Auburger G., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Van Deerlin V.M., Bonini N.M., Gitler A.D. 2010. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466: 1069-1075
- Exome Variant Server. 2015. National Heart, Lung and Blood Institute, Washington, ZDA. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (30. maj 2015)
- Fecto F., Yan J., Vemula S.P., Liu E., Yang Y., Chen W., Zheng J.G., Shi Y., Siddique N., Arrat H., Donkervoort S., Ajroud-Driss S., Sufit R.L., Heller S.L., Deng H.X., Siddique T. 2011. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 68: 1440-1446
- Feinberg A.P. 2007. phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447: 433-440
- Felbeck A., Camu W., Valdmanis P.N., Sperfeld A.D., Waibel S., Steinbach P., Rouleau G.A., Ludolph A.C., Andersen P.M. 2010. Four familial ALS pedigrees discordant for

- two SOD1 mutations: are all SOD1 mutations pathogenic? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81: 572-577
- Ferri G., Huichalaf C.H., Caccia R., Gabellini D. 2015. Direct interplay between two candidate genes in FSHD muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 24: 1256-1266
- Figueroa-Romero C., Hur J., Bender D.E., Delaney C.E., Cataldo M.D., Smith A.L., Yung R., Ruden D.M., Callaghan B.C., Feldman E.L. 2012. Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 7: e52672
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9: 102-114
- Floris G., Borghero G., Cannas A., Di Stefano F., Costantino E., Murru M.R., Brunetti M., Restagno G., Traynor B.J., Marrosu M.G., Chio A., Marrosu F. 2012. Frontotemporal dementia with psychosis, parkinsonism, visuo-spatial dysfunction, upper motor neuron involvement associated to expansion of C9ORF72: a peculiar phenotype? *Journal of Neurology*, 259: 1749-1751
- Fogh I., Ratti A., Gellera C., Lin K., Tiloca C., Moskvina V., Corrado L., Sorarù G., Cereda C., Corti S., Gentilini D., Calini D., Castellotti B., Mazzini L., Querin G., Gagliardi S., Del Bo R., Conforti F.L., Siciliano G., Inghilleri M., Saccà F., Bongioanni P., Penco S., Corbo M., Sorbi S., Filosto M., Ferlini A., Di Blasio A.M., Signorini S., Shatunov A., Jones A., Shaw P.J., Morrison K.E., Farmer A.E., Van Damme P., Robberecht W., Chiò A., Traynor B.J., Sendtner M., Melki J., Meininger V., Hardiman O., Andersen P.M., Leigh N.P., Glass J.D., Overste D., Diekstra F.P., Veldink J.H., van Es M.A., Shaw C.E., Weale M.E., Lewis C.M., Williams J., Brown R.H., Landers J.E., Ticozzi N., Ceroni M., Pegoraro E., Comi G.P., D'Alfonso S., van den Berg L.H., Taroni F., Al-Chalabi A., Powell J., Silani V. 2014. A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 23: 2220-2231
- Freischmidt A., Muller K., Ludolph A.C., Weishaupt J.H. 2013. Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 1: 42
- Freischmidt A., Muller K., Zondler L., Weydt P., Volk A.E., Bozic A.L., Walter M., Bonin M., Mayer B., von Arnim C.A., Otto M., Dieterich C., Holzmann K., Andersen P.M., Ludolph A.C., Danzer K.M., Weishaupt J.H. 2014. Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain*, 137: 2938-2950
- Gallez-Hawkins G.M., Li X., Franck A.E., Gendzekhadze K., Nakamura R., Forman S.J., Senitzer D., Zaia J.A. 2012. KIR2DS2 and KIR2DS4 promoter hypomethylation patterns in patients undergoing hematopoietic cell transplantation (HCT). *Human Immunology*, 73: 1109-1115

- Gene Cards. 2015. The Human Gene Database. Weizmann Institute of Science, Izrael.  
<http://www.genecards.org/> (30. maj 2015)
- Gokey N.G., Srinivasan R., Lopez-Anido C., Krueger C., Svaren J. 2012. Developmental regulation of microRNA expression in Schwann cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32: 558-568
- Greenway M.J., Andersen P.M., Russ C., Ennis S., Cashman S., Donaghy C., Patterson V., Swingler R., Kieran D., Prehn J., Morrison K.E., Green A., Acharya K.R., Brown R.H., Jr., Hardiman O. 2006. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 38: 411-413
- Guerreiro R.J., Schymick J.C., Crews C., Singleton A., Hardy J., Traynor B.J. 2008. TDP-43 is not a common cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 3: e2450, doi:10.1371/journal.pone.0002450
- Hackett J.A., Surani M.A. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368: 20110328
- Hantash F.M., Goos D.G., Tsao D., Quan F., Buller-Burckle A., Peng M., Jarvis M., Sun W., Strom C.M. 2010. Qualitative assessment of FMR1 (CGG)<sub>n</sub> triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening. *Genetics in Medicine*, 12: 162-173
- Hara M., Minami M., Kamei S., Suzuki N., Kato M., Aoki M. 2012. Lower motor neuron disease caused by a novel FUS/TLS gene frameshift mutation. *Journal of Neurology*, 259: 2237-2239
- Heard E., Clerc P., Avner P. 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annual Review of Genetics*, 31: 571-610
- Hebsgaard S.M., Korning P.G., Tolstrup N., Engelbrecht J., Rouze P., Brunak S. 1996. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, 24: 3439-3452
- Hernandez D.G., Nalls M.A., Gibbs J.R., Arepalli S., van der Brug M., Chong S., Moore M., Longo D.L., Cookson M.R., Traynor B.J., Singleton A.B. 2011. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Human Molecular Genetics*, 20: 1164-1172
- HGNC. 2015. HUGO Gene Nomenclature Committee, European Bioinformatics Institute, Cambridge, Velika Britanija  
<http://www.genenames.org/> (30. maj 2015)
- Hsieh C.L. 1994. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 5487-5494
- Hu J., Kong M., Ye Y., Hong S., Cheng L., Jiang L. 2014. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurochemistry*, 129: 877-883

- Huang B. 2007. Genes and genomes. University of California, School of Medicine, Office of Educational Technology. California, ZDA.  
[http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes\\_and\\_genomes/methylation.html](http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html) (30.maj 2015)
- Hurst L.D. 2006. Preliminary assessment of the impact of microRNA-mediated regulation on coding sequence evolution in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 63: 174-182
- Jeffrey P.L., Capes-Davis A., Dunn J.M., Tolhurst O., Seeto G., Hannan A.J., Lin S.L. 2000. CROC-4: a novel brain specific transcriptional activator of c-fos expressed from proliferation through to maturation of multiple neuronal cell types. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16: 185-196
- Johnson J.O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., Van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Gibbs J.R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., Ding J., McCluskey L., Martinez-Lage M., Falcone D., Hernandez D.G., Arepalli S., Chong S., Schymick J.C., Rothstein J., Landi F., Wang Y.D., Calvo A., Mora G., Sabatelli M., Monsurro M.R., Battistini S., Salvi F., Spataro R., Sola P., Borghero G., Galassi G., Scholz S.W., Taylor J.P., Restagno G., Chiò A., Traynor B.J. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, 68: 857-864
- Jones P.A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13: 484-492
- Jones T.I., Yan C., Sapp P.C., McKenna-Yasek D., Kang P.B., Quinn C., Salameh J.S., King O.D., Jones P.L. 2014. Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing. *Clinical Epigenetics*, 6: 23
- Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P., Spiegelman D., McConkey B.J., Vande Velde C., Bouchard J.P., Lacomblez L., Pochigaeva K., Salachas F., Pradat P.F., Camu W., Meininger V., Dupre N., Rouleau G.A. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 40: 572-574
- Kawahara Y., Mieda-Sato A. 2012. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *PNAS*, 109: 3347-3352
- Keller B.A., Volkening K., Droppelmann C.A., Ang L.C., Rademakers R., Strong M.J. 2012. Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathologica*, 124: 733-747
- Kim V.N., Han J., Siomi M.C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 126-139
- Kim Y.K., Kim V.N. 2007. Processing of intronic microRNAs. *The Embo journal*, 26: 775-783
- Klose R.J., Bird A.P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31: 89-97
- Knudsen S. 1991. Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 220: 49-65

- Koppers M., Groen E.J., van Vught P.W., van Rheenen W., Witteveen E., van Es M.A., Pasterkamp R.J., van den Berg L.H., Veldink J.H. 2013. Screening for rare variants in the coding region of ALS-associated genes at 9p21.2 and 19p13.3. *Neurobiology of Aging*, 34, 5: 1518.e5-7, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.018
- Kos A., Olde Loohuis N.F., Wiczorek M.L., Glennon J.C., Martens G.J., Kolk S.M., Aschrafi A. 2012. A potential regulatory role for intronic microRNA-338-3p for its host gene encoding apoptosis-associated tyrosine kinase. *PLoS One*, 7, 2: e31022, doi: 10.1371/journal.pone.0031022
- Kwiatkowski T.J., Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vanderburg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G.A., Hosler B.A., Cortelli P., de Jong P.J., Yoshinaga Y., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P.C., Horvitz H.R., Landers J.E., Brown R.H. Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323: 1205-1208
- Kye M.J., Goncalves Ido C. 2014. The role of miRNA in motor neuron disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8: 15
- Lagier-Tourenne C., Cleveland D.W. 2009. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell*, 136: 1001-1004
- Lagier-Tourenne C., Baughn M., Rigo F., Sun S., Liu P., Li H.R., Jiang J., Watt A.T., Chun S., Katz M., Qiu J., Sun Y., Ling S.C., Zhu Q., Polymenidou M., Drenner K., Artates J.W., McAlonis-Downes M., Markmiller S., Hutt K.R., Pizzo D.P., Cady J., Harms M.B., Baloh R.H., Vandenberg S.R., Yeo G.W., Fu X.D., Bennett C.F., Cleveland D.W., Ravits J. 2013. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *PNAS*, 110: E4530-4539
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12: 735-739
- Lai S.L., Abramzon Y., Schymick J.C., Stephan D.A., Dunckley T., Dillman A., Cookson M., Calvo A., Battistini S., Giannini F., Caponnetto C., Mancardi G.L., Spataro R., Monsurro M.R., Tedeschi G., Marinou K., Sabatelli M., Conte A., Mandrioli J., Sola P., Salvi F., Bartolomei I., Lombardo F., Mora G., Restagno G., Chiò A., Traynor B.J. 2011. FUS mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 32, 3: 550.e1-4, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.12.020
- Latham G.J. 2010. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. *Methods in Molecular Biology*, 667: 19-31
- Leblond C.S., Kaneb H.M., Dion P.A., Rouleau G.A. 2014. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 262, Pt, B: 91-101

- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120: 15-20
- Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. .1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69: 915-926
- Li E., Beard C., Jaenisch R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366: 362-365
- Li L.C., Dahiya R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18: 1427-1431
- Li T.M., Alberman E., Swash M. 1988. Comparison of sporadic and familial disease amongst 580 cases of motor neuron disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 51: 778-784
- Ling S.C., Albuquerque C.P., Han J.S., Lagier-Tourenne C., Tokunaga S., Zhou H., Cleveland D.W. 2010. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *PNAS*, 107: 13318-13323
- Liscic R.M., Grinberg L.T., Zidar J., Gitcho M.A., Cairns N.J. 2008. ALS and FTLT: two faces of TDP-43 proteinopathy. *European Journal of Neurology*, 15: 772-780
- Lister R., O'Malley R.C., Tonti-Filippini J., Gregory B.D., Berry C.C., Millar A.H., Ecker J.R. 2008. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133: 523-536
- Logroscino G., Traynor B.J., Hardiman O., Chio A., Mitchell D., Swingler R.J., Millul A., Benn E., Beghi E. 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81: 385-390
- Lu H., Liu X., Deng Y., Qing H. 2013. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5: 85
- Lungu G., Stoica G., Ambrus A. 2013. MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neurosci Letters*, 553: 153-158
- Mackenzie I.R., Bigio E.H., Ince P.G., Geser F., Neumann M., Cairns N.J., Kwong L.K., Forman M.S., Ravits J., Stewart H., Eisen A., McClusky L., Kretschmar H.A., Monoranu C.M., Highley J.R., Kirby J., Siddique T., Shaw P.J., Lee V.M., Trojanowski J.Q. 2007. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61: 427-434
- Majounie E., Renton A.E., Mok K., Dopper E.G., Waite A., Rollinson S., Chiò A., Restagno G., Nicolaou N., Simon-Sanchez J., van Swieten J.C., Abramzon Y., Johnson J.O., Sendtner M., Pamphlett R., Orrell R.W., Mead S., Sidle K.C., Houlden H., Rohrer J.D., Morrison K.E., Pall H., Talbot K., Ansorge O., Hernandez D.G., Arepalli S., Sabatelli M., Mora G., Corbo M., Giannini F., Calvo A., Englund E., Borghero G., Floris G.L., Remes A.M., Laaksovirta H., McCluskey L., Trojanowski J.Q., Van Deerlin V.M., Schellenberg G.D., Nalls M.A., Drory V.E., Lu C.S., Yeh T.H., Ishiura H., Takahashi Y., Tsuji S., Le Ber I., Brice

- A., Drepper C., Williams N., Kirby J., Shaw P., Hardy J., Tienari P.J., Heutink P., Morris H.R., Pickering-Brown S., Traynor B.J. 2012. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, 11: 323-330
- Marcuzzo S., Kapetis D., Mantegazza R., Baggi F., Bonanno S., Barzago C., Cavalcante P., Kerlero de Rosbo N., Bernasconi P. 2014. Altered miRNA expression is associated with neuronal fate in G93A-SOD1 ependymal stem progenitor cells. *Experimental Neurology*, 253: 91-101
- Maruyama H., Morino H., Ito H., Izumi Y., Kato H., Watanabe Y., Kinoshita Y., Kamada M., Nodera H., Suzuki H., Komure O., Matsuura S., Kobatake K., Morimoto N., Abe K., Suzuki N., Aoki M., Kawata A., Hirai T., Kato T., Ogasawara K., Hirano A., Takumi T., Kusaka H., Hagiwara K., Kaji R., Kawakami H. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465: 223-226
- Mazin A.L. 2009. Suicidal function of DNA methylation in age-related genome disintegration. *Ageing Research Reviews*, 8: 314-327
- Miller T.M., Pestronk A., David W., Rothstein J., Simpson E., Appel S.H., Andres P.L., Mahoney K., Allred P., Alexander K., Ostrow L.W., Schoenfeld D., Macklin E.A., Norris D.A., Manousakis G., Crisp M., Smith R., Bennett C.F., Bishop K.M., Cudkovic M.E. 2013. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology*, 12: 435-442
- Mitchell J., Paul P., Chen H.J., Morris A., Payling M., Falchi M., Habgood J., Panoutsou S., Winkler S., Tisato V., Hajitou A., Smith B., Vance C., Shaw C., Mazarakis N.D., de Belleruche J. 2010. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *PNAS*, 107: 7556-7561
- Morahan J.M., Yu B., Trent R.J., Pamphlett R. 2009. A genome-wide analysis of brain DNA methylation identifies new candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Sclerosis*, 10: 418-429
- Morel L., Regan M., Higashimori H., Ng S.K., Esau C., Vidensky S., Rothstein J., Yang Y. 2013. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 7105-7116
- Morlando M., Dini Modigliani S., Torrelli G., Rosa A., Di Carlo V., Caffarelli E., Bozzoni I. 2012. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO Journal*, 31: 4502-4510
- Moscovich M., LeDoux M.S., Xiao J., Rampon G.L., Vemula S.R., Rodriguez R.L., Foote K.D., Okun M.S. 2013. Dystonia, facial dysmorphism, intellectual disability and breast cancer associated with a chromosome 13q34 duplication and overexpression of TFDP1: case report. *BMC Medical Genetics*, 14: 70
- Nackley A.G., Shabalina S.A., Tchivileva I.E., Satterfield K., Korchynskyi O., Makarov S.S., Maixner W., Diatchenko L. 2006. Human catechol-O-methyltransferase

- haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*, 314: 1930-1933
- Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314: 130-133
- Nielsen S., Hvid T., Kelly M., Lindegaard B., Dethlefsen C., Winding K., Mathur N., Scheele C., Pedersen B.K., Laye M.J. 2013. Muscle specific miRNAs are induced by testosterone and independently upregulated by age. *Frontiers in Physiology*, 4: 394
- Nishimura A.L., Mitne-Neto M., Silva H.C., Richieri-Costa A., Middleton S., Cascio D., Kok F., Oliveira J.R., Gillingwater T., Webb J., Skehel P., Zatz M. 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Human Genetics*, 75: 822-831
- O'Connell R.M., Rao D.S., Chaudhuri A.A., Baltimore D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10: 111-122
- Oates N., Pamphlett R. 2007. An epigenetic analysis of SOD1 and VEGF in ALS. *Amyotroph Lateral Sclerosis*, 8: 83-86
- OMIM. 2015. Online Mendelian Inheritance in Man. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Johns Hopkins University, ZDA.  
<http://www.omim.org/> (30. maj 2015)
- Orlacchio A., Babalini C., Borreca A., Patrono C., Massa R., Basaran S., Munhoz R.P., Rogaeva E.A., St George-Hyslop P.H., Bernardi G., Kawarai T. 2010. SPATACIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 133: 591-598
- Otaegi G., Pollock A., Sun T. 2011a. An Optimized Sponge for microRNA miR-9 Affects Spinal Motor Neuron Development in vivo. *Frontiers in Neuroscience*, 5: 146
- Otaegi G., Pollock A., Hong J., Sun T. 2011b. MicroRNA miR-9 modifies motor neuron columns by a tuning regulation of FoxP1 levels in developing spinal cords. *Journal of Neuroscience*, 31: 809-818
- Paez-Colasante X., Figueroa-Romero C., Sakowski S.A., Goutman S.A., Feldman E.L. 2015. Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. *Nature Reviews Neurology*, 11: 266-279
- Park J., Xu K., Park T., Yi S.V. 2012. What are the determinants of gene expression levels and breadths in the human genome? *Human Molecular Genetics*, 21: 46-56
- Pillai R.S. 2005. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 11: 1753-1761
- Pillai R.S., Bhattacharyya S.N., Filipowicz W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17: 118-126

- Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K.R., Huelga S.C., Moran J., Liang T.Y., Ling S.C., Sun E., Wancewicz E., Mazur C., Kordasiewicz H., Sedaghat Y., Donohue J.P., Shiue L., Bennett C.F., Yeo G.W., Cleveland D.W. 2011. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature Neuroscience*, 14: 459-468
- Prudencio M., Hart P.J., Borchelt D.R., Andersen P.M. 2009. Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease. *Human Molecular Genetics*, 18: 3217-3226
- PubMed. 2015. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. ZDA.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (30. maj 2015)
- Qureshi I.A., Mehler M.F. 2013. Epigenetic mechanisms governing the process of neurodegeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 875-882
- Qureshi I.A., Mattick J.S., Mehler M.F. 2010. Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Research*, 1338: 20-35
- Rajender S., Avery K., Agarwal A. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research*, 727: 62-71
- Ratti A., Corrado L., Castellotti B., Del Bo R., Fogh I., Cereda C., Tiloca C., D'Ascenzo C., Bagarotti A., Pensato V., Ranieri M., Gagliardi S., Calini D., Mazzini L., Taroni F., Corti S., Ceroni M., Oggioni G.D., Lin K., Powell J.F., Sorarù G., Ticozzi N., Comi G.P., D'Alfonso S., Gellera C., Silani V. 2012. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiology of Aging*, 33, 10: 2528.e7-14, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.008
- Regal L., Vanopdenbosch L., Tilkin P., Van den Bosch L., Thijs V., Sciot R., Robberecht W. 2006. The G93C mutation in superoxide dismutase 1: clinicopathologic phenotype and prognosis. *Archives of Neurology*, 63: 262-267
- Renton A.E., Chio A., Traynor B.J. 2014. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, 17: 17-23
- Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simón-Sánchez J., Rollinson S., Gibbs J.R., Schymick J.C., Laaksovirta H., van Swieten J.C., Myllykangas L., Kalimo H., Paetau A., Abramzon Y., Remes A.M., Kaganovich A., Scholz S.W., Duckworth J., Ding J., Harmer D.W., Hernandez D.G., Johnson J.O., Mok K., Ryten M., Trabzuni D., Guerreiro R.J., Orrell R.W., Neal J., Murray A., Pearson J., Jansen I.E., Sondervan D., Seelaar H., Blake D., Young K., Halliwell N., Callister J.B., Toulson G., Richardson A., Gerhard A., Snowden J., Mann D., Neary D., Nalls M.A., Peuralinna T., Jansson L., Isoviita V.M., Kaivorinne A.L., Hölttä-Vuori M., Ikonen E., Sulkava R., Benatar M., Wu J., Chiò A., Restagno G., Borghero G., Sabatelli M., Heckerman D., Rogaeva E., Zinman L., Rothstein J.D., Sendtner M., Drepper C., Eichler E.E., Alkan C., Abdullaev Z., Pack S.D., Dutra A., Pak E., Hardy J., Singleton A., Williams N.M., Heutink P., Pickering-Brown S., Morris H.R., Tienari P.J., Traynor B.J. 2011. A

- hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72: 257-268
- Rosen D.R. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362: 59-62
- Rothstein J.D. 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 65 Supplemental 1: S3-9
- Rowland L.P., Shneider N.A. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 344: 1688-1700
- Russell A.P., Wada S., Vergani L., Hock M.B., Lamon S., Leger B., Ushida T., Cartoni R., Wadley G.D., Hespel P., Kralli A., Soraru G., Angelini C., Akimoto T 2013. Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 49: 107-117
- Rutherford N.J., Zhang Y.J., Baker M., Gass J.M., Finch N.A., Xu Y.F., Stewart H., Kelley B.J., Kuntz K., Crook R.J., Sreedharan J., Vance C., Sorenson E., Lipka C., Bigio E.H., Geschwind D.H., Knopman D.S., Mitumoto H., Petersen R.C., Cashman N.R., Hutton M., Shaw C.E., Boylan K.B., Boeve B., Graff-Radford N.R., Wszolek Z.K., Caselli R.J., Dickson D.W., Mackenzie I.R., Petrucelli L., Rademakers R. 2008. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genetics*, 4, 9: e1000193, doi: 10.1371/journal.pgen.1000193
- Salmena L., Poliseno L., Tay Y., Kats L., Pandolfi P.P. 2011. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146: 353-358
- Shioya M., Obayashi S., Tabunoki H., Arima K., Saito Y., Ishida T., Satoh J. 2010. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36: 320-330
- Siddique T., Pericak-Vance M.A., Brooks B.R., Roos R.P., Hung W.Y., Antel J.P., Munsat T.L., Phillips K., Warner K., Speer M. 1989. Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 39: 919-925
- Smith B.N., Newhouse S., Shatunov A., Vance C., Topp S., Johnson L., Miller J., Lee Y., Troakes C., Scott K.M., Jones A., Gray I., Wright J., Hortobágyi T., Al-Sarraj S., Rogelj B., Powell J., Lupton M., Lovestone S., Sapp P.C., Weber M., Nestor P.J., Schelhaas H.J., Asbroek A.A., Silani V., Gellera C., Taroni F., Ticozzi N., Van den Berg L., Veldink J., Van Damme P., Robberecht W., Shaw P.J., Kirby J., Pall H., Morrison K.E., Morris A., de Belleruche J., Vianney de Jong J.M., Baas F., Andersen P.M., Landers J., Brown R.H. Jr, Weale M.E., Al-Chalabi A., Shaw C.E. 2013. The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *European Journal of Human Genetics*, 21: 102-108
- Smith P.J., Zhang C., Wang J., Chew S.L., Zhang M.Q., Krainer A.R. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Human Molecular Genetics*, 15: 2490-2508

- Smith P.Y., Delay C., Girard J., Papon M.A., Planel E., Sergeant N., Buee L., Hebert S.S. 2011. MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Human Molecular Genetics*, 20: 4016-4024
- Smith R.A., Miller T.M., Yamanaka K., Monia B.P., Condon T.P., Hung G., Lobsiger C.S., Ward C.M., McAlonis-Downes M., Wei H., Wancewicz E.V., Bennett C.F., Cleveland D.W. 2006b. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 2290-2296
- Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., Baralle F., de Belleruche J., Mitchell J.D., Leigh P.N., Al-Chalabi A., Miller C.C., Nicholson G., Shaw C.E. 2008. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319: 1668-1672
- Staszewski O., Prinz M. 2014. Glial epigenetics in neuroinflammation and neurodegeneration. *Cell and Tissue Research*, 356: 609-616
- Stauffer B.L., Sobus R.D., Sucharov C.C. 2011. Sex differences in cardiomyocyte connexin43 expression. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58: 32-39
- Strong M.J. 2010. The evidence for altered RNA metabolism in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of the Neurological Sciences*, 288: 1-12
- Strong M.J., Hudson A.J., Alvord W.G. 1991. Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850-1989: a statistical analysis of the world literature. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 18: 45-58
- Takai D., Jones P.A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *PNAS*, 99: 3740-3745
- Ticozzi N., Tiloca C., Morelli C., Colombrita C., Poletti B., Doretti A., Maderna L., Messina S., Ratti A., Silani V. 2011. Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Archives Italiennes de Biologie*, 149: 65-82
- Ticozzi N., Silani V., LeClerc A.L., Keagle P., Gellera C., Ratti A., Taroni F., Kwiatkowski T.J., Jr., McKenna-Yasek D.M., Sapp P.C., Brown R.H., Jr., Landers J.E. 2009. Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology*, 73: 1180-1185
- Tinelli E., Pereira J.A., Suter U. 2013. Muscle-specific function of the centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy-associated dynamin 2 is required for proper lipid metabolism, mitochondria, muscle fibers, neuromuscular junctions and peripheral nerves. *Human Molecular Genetics*, 22: 4417-4429
- Toivonen J.M., Manzano R., Olivan S., Zaragoza P., Garcia-Redondo A., Osta R. 2014. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 9, 2: e89065, doi: 10.1371/journal.pone.0089065
- Tremolizzo L., Messina P., Conti E., Sala G., Cecchi M., Airolidi L., Pastorelli R., Pupillo E., Bandettini Di Poggio M., Filosto M., Lunetta C., Agliardi C., Guerini F., Mandrioli J., Calvo A., Beghi E., Ferrarese C. 2014. Whole-blood global DNA methylation is increased in amyotrophic lateral sclerosis independently of age of onset. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15: 98-105

- Tsuji S. 2013. The neurogenomics view of neurological diseases. *JAMA Neurology*, 70: 689-694
- Turner M.R., Hammers A., Al-Chalabi A., Shaw C.E., Andersen P.M., Brooks D.J., Leigh P.N. 2005. Distinct cerebral lesions in sporadic and 'D90A' SOD1 ALS: studies with [11C]flumazenil PET. *Brain*, 128: 1323-1329
- University of Chicago Medicine. 2015. Healthy neuron compared to diseased one. <http://www.uchospitals.edu/online-library/content=P00771>.
- Urduinguio R.G., Sanchez-Mut J.V., Esteller M. 2009. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *The Lancet Neurology*, 8: 1056-1072
- Van Deerlin V.M., Leverenz J.B., Bekris L.M., Bird T.D., Yuan W., Elman L.B., Clay D., Wood E.M., Chen-Plotkin A.S., Martinez-Lage M., Steinbart E., McCluskey L., Grossman M., Neumann M., Wu I.L., Yang W.S., Kalb R., Galasko D.R., Montine T.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Schellenberg G.D., Yu C.E. 2008. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology*, 7: 409-416
- Vance C., Rogelj B., Hortobágyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., Ganesalingam J., Williams K.L., Tripathi V., Al-Saraj S., Al-Chalabi A., Leigh P.N., Blair I.P., Nicholson G., de Belleruche J., Gallo J.M., Miller C.C., Shaw C.E. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323: 1208-1211
- Vrabec K., Koritnik B., Leonardis L., Dolenc-Groselj L., Zidar J., Smith B., Vance C., Shaw C., Rogelj B., Glavac D., Ravnik-Glavac M. 2015. Genetic analysis of amyotrophic lateral sclerosis in the Slovenian population. *Neurobiology of Aging*, 2015: doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.011
- Wang H.Y., Wang I.F., Bose J., Shen C.K. 2004. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*, 83: 130-139
- Wang K., Yuan Y., Cho J.H., McClarty S., Baxter D., Galas D.J. 2012. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*, 2012: doi: 10.1371/journal.pone.0041561
- Weber B., Stresemann C., Brueckner B., Lyko F. 2007a. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6: 1001-1005
- Wijesekera L.C., Leigh P.N. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 377, 9769: 942-955
- Williams A.E. 2008. Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 545-562
- Williams A.H., Valdez G., Moresi V., Qi X., McAnally J., Elliott J.L., Bassel-Duby R., Sanes J.R., Olson E.N. 2009. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science*, 326: 1549-1554

- Williams K.L., Fifita J.A., Vucic S., Durnall J.C., Kiernan M.C., Blair I.P., Nicholson G.A. 2013. Pathophysiological insights into ALS with C9ORF72 expansions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 84: 931-935
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I., Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11: 228-234
- Wojdacz T.K., Dobrovic A. 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*, 35: 41
- Wu C.H., Fallini C., Ticozzi N., Keagle P.J., Sapp P.C., Piotrowska K., Lowe P., Koppers M., McKenna-Yasek D., Baron D.M., Kost J.E., Gonzalez-Perez P., Fox A.D., Adams J., Taroni F., Tiloca C., Leclerc A.L., Chafe S.C., Mangroo D., Moore M.J., Zitzewitz J.A., Xu Z.S., van den Berg L.H., Glass J.D., Siciliano G., Cirulli E.T., Goldstein D.B., Salachas F., Meininger V., Rossoll W., Ratti A., Gellera C., Bosco D.A., Bassell G.J., Silani V., Drory V.E., Brown R.H. Jr, Landers J.E. 2012. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 488: 499-503
- Xi Z., Zinman L., Moreno D., Schymick J., Liang Y., Sato C., Zheng Y., Ghani M., Dib S., Keith J., Robertson J., Rogaeva E. 2013. Hypermethylation of the CpG Island Near the G4C2 Repeat in ALS with a C9orf72 Expansion. *The American Journal of Human Genetics*, 92: 981-989
- Yan J., Deng H.X., Siddique N., Fecto F., Chen W., Yang Y., Liu E., Donkervoort S., Zheng J.G., Shi Y., Ahmeti K.B., Brooks B., Engel W.K., Siddique T. 2010. Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*, 75: 807-814
- Yang Y., Hentati A., Deng H.X., Dabbagh O., Sasaki T., Hirano M., Hung W.Y., Ouahchi K., Yan J., Azim A.C., Cole N., Gascon G., Yagmour A., Ben-Hamida M., Pericak-Vance M., Hentati F., Siddique T. 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 29: 160-165
- Yao Z., Snider L., Balog J., Lemmers R.J., Van Der Maarel S.M., Tawil R., Tapscott S.J. 2014. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, 23: 5342-5352
- Ying S.Y., Chang D.C., Lin S.L. 2008. The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Molecular Biotechnology*, 38: 257-268
- Yu W., Jin C., Lou X., Han X., Li L., He Y., Zhang H., Ma K., Zhu J., Cheng L., Lin B. 2011. Global analysis of DNA methylation by Methyl-Capture sequencing reveals epigenetic control of cisplatin resistance in ovarian cancer cell. *PLoS One*, 6, 12: e29450, doi: 10.1371/journal.pone.0029450
- Zhao Y., Sun J., Zhang H., Guo S., Gu J., Wang W., Tang N., Zhou X., Yu J. 2014. High-frequency aberrantly methylated targets in pancreatic adenocarcinoma identified via global DNA methylation analysis using methylCap-seq. *Clinical Epigenetics*, 6: 18

- Zhou F., Guan Y., Chen Y., Zhang C., Yu L., Gao H., Du H., Liu B., Wang X. 2013. miRNA-9 expression is upregulated in the spinal cord of G93A-SOD1 transgenic mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6: 1826-1838
- Zhu H., Bhattacharyya B.J., Lin H., Gomez C.M. 2013. Skeletal muscle calpain acts through nitric oxide and neural miRNAs to regulate acetylcholine release in motor nerve terminals. *The Journal of Neuroscience*, 33: 7308-7324
- Zou L., Yan S., Guan X., Pan Y., Qu X. 2013. Hypermethylation of the PRKCZ Gene in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2013: 721493, doi:10.1155/2013/721493: 4 str.
- 1000 Genomes Project Consortium. 2012. A Deep Catalog of Human Genetic Variation. <http://www.1000genomes.org/> (30. maj 2015)

## ZAHVALA

Najprej se najlepše zahvaljujem moji mentorici, prof. dr. Metki Ravnik-Glavač, za vso podporo ter usmerjanje tekom raziskovalnega dela. Poleg tega pa seveda tudi hvala za zaupanje in dano možnost dela kot vaša mlada raziskovalka.

Sodelavci, Andrej, Emanuela, Alenka, Mojca, Nina, Sonja & Borut – takšne bi si želel vsak! Hvala vsem za nesebično pomoč pri raziskovalnem delu, bili ste neizčrpen vir rešitev za vsak problem ter odlična družba tudi v bolj sproščenih trenutkih. Emanuela, posebej hvala za pomoč pri analizi qPCR in tudi za popoldansko dozo kofeina v zadnjih mesecih!

Posebna zahvala gre mojima staršema, brez vajine podpore tekom celotnega študija me pot ne bi pripeljala do tu, kjer sem. Hvala za potrpežljivost in razumevanje, predvsem pa hvala za dobre gene.

Hvala prijateljem, ki mi vedno stojite ob strani, dragoceni ste! Še posebej se zahvaljujem Nini Hudej, najboljša si in taka tudi ostani!

Za vso podporo in razumevanje, predvsem pa za čustveno toplino, se prisrčno zahvaljujem mojemu partnerju. Marko, hvala ti, brez tebe bi v življenju manjkalo mavrice!