

AGNIESZKA STEMBAŁSKA<sup>1</sup>, ARLETA LEBIODA<sup>2</sup>, ANNA JONKISZ<sup>2</sup>, MAGDALENA ŻOŁĘDZIEWSKA<sup>2</sup>,  
TADEUSZ DOBOSZ<sup>2</sup>, MARIA SĄSIADK<sup>1</sup>

## Polimorfizm kodonu 129 w genie *prnp* w populacji Dolnego Śląska

### Codon 129 Polymorphism of the *prnp* Gene in Population of Lower Silesia

<sup>1</sup> Zakład Genetyki Katedry Patofizjologii AM we Wrocławiu

<sup>2</sup> Zakład Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej AM we Wrocławiu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Polimorfizm w kodonie 129 (metionina/walina) genu *prnp* wpływa na kliniczną prezentację postaci dziedzicznych i pozagenetycznych chorób prionowych. U 37% populacji kaukaskiej występuje homozygotyzm dla metioniny, a u 12% homozygotyzm dla waliny w kodonie 129 genu białka prionowego.

**Cel pracy.** Oznaczenie polimorfizmu w kodonie 129 w zdrowej populacji Dolnego Śląska.

**Materiał i metody.** Badania przeprowadzono u 105 osób ze zdrowej populacji Dolnego Śląska (48 kobiet i 57 mężczyzn) na DNA wyizolowanym z krwi obwodowej. Reakcję PCR i analizę sekwencji kodonu 129 w ABI-310 wykonano według standardowych procedur. Ocena wyników badań uzyskano za pomocą programu Genescan (Applied Biosystems).

**Wyniki.** Analiza molekularna wykazała, że częstość występowania homozygot metionina/metionina wynosiła 46,7%, homozygot walina/walina 5,7% i heterozygot metionina/walina 47,6%.

**Wnioski.** Genetyczna analiza genu *prnp* wskazuje na przewagę heterozygot Met/Val w kodonie 129 w populacji Dolnego Śląska (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 671–675).

**Słowa kluczowe:** choroby prionowe, gen *prnp*, polimorfizm 129.

#### Abstract

**Background.** The codon 129 polymorphism in prion protein gene (*prnp*) results from either a methionine residue (Met) or a valine residue (Val). This polymorphism has a phenotypic influence on both inherited as well non-genetic forms of prion diseases. Met/Met homozygotes were observed in 37% while Val/Val homozygotes in 12% of normal Caucasian population.

**Objectives.** Investigation of codon 129 polymorphism in healthy population of Lower Silesia.

**Material and Methods.** We characterized the valine and methionine alleles frequency at codon 129 in 105 individuals representing the normal population of Lower Silesia (48 female and 57 male). Analyses were performed on DNA isolated from peripheral blood lymphocytes. PCR reactions and analysis of 129 codon sequence in ABI-310 were carried out following standard procedures using Genescan software (Applied Biosystems).

**Results.** Molecular analysis of codon 129 showed homozygosity for Met/Met in 46.7% of cases, homozygosity for Val/Val in 5.7% and heterozygosity for Met/Val in 47.6%.

**Conclusion.** A genetic analysis of the prion protein gene showed overrepresentation of heterozygosity for Met/Val at the polymorphic codon 129 in population of Lower Silesia (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 671–675).

**Keywords:** prion disease, *prnp* gene, codon 129 polymorphism.

Choroby wywołane prionami (*prion diseases*), tzw. pasażowalne encefalopatie gąbczaste (TSE – *transmissible spongiform encephalopathies*), charakteryzują się zmianami degeneracyjnymi w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Ich przyczyną

jest defekt w glikoproteinie błonowej obecnej głównie w tkance nerwowej, tzw. białku prionowym (PrP – *prion protein*). Priony (*proteinaceous infectious particles prion*) są białkami prawidłowo występującymi w neuronach mózgowia (PrP<sup>C</sup> – izoforma ko-

mórkowa), biorą udział w stabilizacji komórek mózgowych, w regulacji rytmu snu i czuwania oraz w procesach uczenia się i zapamiętywania. Białko prionowe jest kodowane przez gen *prnp* (*prion protein gene*), który jest umiejscowiony w ramieniu krótkim chromosomu 20. Przekształcenie prawidłowego białka prionowego (PrP<sup>C</sup>) w białko patogenne (PrP<sup>Sc</sup>) polega na zmianie jego konformacji przestrzennej. W budowie PrP<sup>C</sup> dominują struktury  $\alpha$ -helikalne i  $\beta$ -kartki, w PrP<sup>Sc</sup> występują głównie struktury  $\beta$ -kartki. Zmiana konformacji prawidłowego białka prionowego, spontaniczna bądź indukowana postacią zakaźną prionu, powoduje gromadzenie się patogennej formy białka w komórce, a następnie jej obumieranie. Przekazywanie konformacji przez PrP<sup>Sc</sup> i przekształcanie PrP<sup>C</sup> jest reakcją autokataliczną, łańcuchową, która rozprzestrzenia się w mózgu, powodując degenerację neuronów [1].

Choroby prionowe mogą być nabyte (zakaźne), dziedziczne lub sporadyczne [2, 3]. Około 5–15% przypadków jest dziedzicznych (autosomalnie dominujący tor dziedziczenia) [2]. Choroby prionowe u ludzi są typowo klasyfikowane według fenotypu jako: kuru, choroba Gerstmann-Sträussler-Scheinkera (GSS – *Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease*), śmiertelna rodzinna bezsenność (FFI – *fatal familial insomnia*), choroba Creutzfeldt-Jakoba (CJD – *familial Creutzfeldt-Jakob disease*).

Mutacje genu *prnp* wykryto we wszystkich przypadkach rodzinnego występowania chorób prionowych [4, 5]. Rola mutacji w cząsteczce PrP polega prawdopodobnie na destabilizacji jej struktury przestrzennej, co ułatwia jej konwersję do izoformy patogennej. Patogenne białko prionowe charakteryzuje się zmiennością właściwości biochemicznych zależnie od różnych typów mutacji w genie *prnp* [6]. Oprócz mutacji patogennych (najczęstsze to mutacje punktowe, insercje, delecje) różnicowanie białka prionowego wynika z występowania polimorfizmów [7]. Jeden z istotnych polimorfizmów to różnicowanie nukleotydów w kodonie 129 *prnp* warunkującym metioninę (Met) lub walinę (Val). Polimorfizm ten nie wywołuje skutków patogennych, ale może wpływać na przebieg choroby prionowej (czyli jej kliniczno-patologiczne objawy) i może być związany ze zwiększoną wrażliwością na zachorowanie na chorobę prionową (homozygoty są bardziej predysponowane do wystąpienia choroby) [7–10]. Celem pracy było oznaczenie polimorfizmu w kodonie 129 genu *prnp* w zdrowej populacji Dolnego Śląska.

## Material i metody

Grupę badaną stanowiło 105 osób, które zgłosiły się do Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej we Wrocławiu w celu wykona-

nia analizy genetycznej w związku z ustaleniem spornego ojcostwa. Wśród badanych było 48 kobiet i 57 mężczyzn. Średnia wieku wynosiła 25 lat. W wywiadzie nie podali jakichkolwiek schorzeń lub dolegliwości. Istniejące przepisy prawne o tajemnicy genetycznej pozwalają na przeprowadzanie badań naukowych takich próbek pod warunkiem pozbawienia ich oznaczeń umożliwiających identyfikację, co uczyniono.

Badania przeprowadzono na DNA wyizolowanym z krwi pełnej pobranej na 3,8% cytrynian sodu. Izolację DNA wykonano metodą standardową. DNA amplifikowano z użyciem primerów PrPF i PrPR (amplifikator UNO-Thermoblock firmy Biometra, Niemcy). Sekwencje primerów skonstruowano na podstawie sekwencji genu *prnp* zaczerpniętej z banku genów NCBI GeneBank Sequence Viewer.

Sekwencja użytych primerów:

PrPF 5' CTC TGC AAG AAG CGC CCG AAG CCT 3'

PrPR 5' GCC TGC TCA TGG CAC TTC CCA GCA 3'

PrPSNAP 5' TG GTG GGG GGC CTT GGC GGC TAC 3'

Do każdej reakcji PCR stosowano około 170 ng genomowego DNA, 30 pmol każdego z primerów, 2 U polimerazy DyNAzyme II Polymerase (Finnzymes, Finlandia), 200  $\mu$ M każdego z deoksynukleotydów oraz 10x bufor do PCR, zawierający 15 mM MgCl<sub>2</sub> (PE Applied Biosystems, USA). Amplifikacja przebiegała według schematu: 95°C 11 min, 30 cykli: 94°C 1 min, 70°C 1 min, 72°C 2 min, następnie końcowa elongacja 60°C 45 min.

Długość amplifikowanego fragmentu wynosiła 349 pz (par zasad).

## Minisekwencjonowanie

Otrzymany po amplifikacji produkt oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Niemcy). Do reakcji minisekwencjonowania wykorzystano zestaw ABI PRISM SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit (PE Applied Biosystems, USA). Po przyłączeniu primerów PrPR i PrPSNAP do sekwencji komplementarnej, położonej w bezpośrednim sąsiedztwie pozycji SNP, polimeraza „AmpliAq DNA Polymerase FS” dobudowuje znakowany fluorescencyjnie pojedynczy dideoksynukleotyd ([F]ddNTP) do końca 3' startera na zamplifikowanej i oczyszczonej matrycy DNA. Po reakcji wydłużania i detekcji niezwiązane dideoksynukleotydy zostały enzymatycznie usunięte za pomocą enzymu SAP (Sigma, USA).

## Elektroforeza

Produkty minisekwencjonowania analizowano w kapilarnym analizatorze genetycznym ABI 310 (PE Biosystems Applied, USA) za pomocą programu GeneScan Analysis Software version 2.1. Produkty po zawieszeniu w formamidzie HD (Sigma, USA) i denaturacji w 95°C poddano elektroforezie kapilarnej z detekcją fluorescencji wzbudzonej światłem lasera argonowego (488 nm). Otrzymane elektroforegramy są funkcją zależności natężenia fluorescencji od czasu oraz liczby skanów. Allele są przedstawiane w postaci kolorowych pików (według [F]ddNTP: A – dR6G zielony, C – dTAMRA czarny, G – dR110 niebieski, T – dROX czerwony). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu *t*-Studenta oraz testu  $\chi^2$ , który sprawdza zgodność rozkładu badanych genotypów z prawem Hardego-Weinberga.

## Wyniki

W badanej populacji Dolnego Śląska stwierdzono, że częstość występowania alleli w kodonie 129 wynosiła odpowiednio 70% Met i 30% Val. Wśród 105 osób badanych było 49 homozygot metionina/metionina (Met/Met) (46,7%), 6 homozygot walina/walina (Val/Val) (5,7%) i 50 heterozygot metionina/walina (Met/Val) (47,6%). Wyniki są istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ; test *t*-Studenta) oraz statystyczne różnice względem oczekiwań są również istotne ( $p \sim 0,15$ ; test  $\chi^2$ ). Wyniki przedstawiono w tabeli 1. i 2. oraz na ryc. 1.

## Omówienie

W populacji kaukaskiej (rasa biała) kodon 129 genu *prnp* koduje w 62,5% metioninę, a w 37,5% walinę. W przedstawianych badaniach w populacji Dolnego Śląska rozkład częstości występowania Met i Val jest podobny (odpowiednio 70% i 30%). Przyjmuje się, że większość, bo około 51% rasy białej, jest heterozygotyczna (Met/Val), około 37% to homozygoty dla kodonu metioniny (Met/Met), a około 12% – homozygoty dla kodonu waliny (Val/Val) [2, 6, 11]. W przeprowadzonych badaniach na Dolnym Śląsku rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów był następujący: heterozygoty – 47,6%, homozygoty dla Met – 46,7% oraz homozygoty dla Val – 5,7%. Podobne wyniki otrzymał Zimmermann et al., którzy badali populację środkowej Europy: 48,7% heterozygot, 43% homozygot dla metioniny i 8,3% homozygot dla waliny [12]. Collinge et al. badając polimorfizm w kodonie 129 u 106 osób zdrowej populacji

**Tabela 1.** Polimorfizm w kodonie 129 w grupie badanych 105 osób

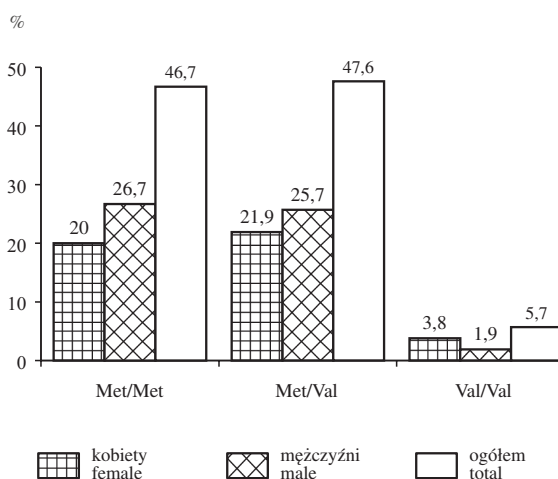
**Table 1.** Codon 129 polymorphism in the group of 105 individuals

Płeć (Gender)	Kodon 129		
	Met/Met	Met/Val	Val/Val
Kobiety (Female)	21	23	4
Mężczyźni (Male)	28	27	2
Ogółem (%) (Total)	49 (46,7)	50 (47,6)	6 (5,7)

**Tabela 2.** Częstość alleli i genotypów w kodonie 129 w grupie 105 badanych ( $0,1 < p < 0,2$ )

**Table 2.** Allele and genotype frequencies at codon 129 in the study group ( $0,1 < p < 0,2$ )

Genotyp (Genotyp)	Liczba otrzymana (Obtained value)	Liczba spodziewana (Expected value)	$\chi^2$	Częstość alleli (Allele frequency)
Met/Met	49	51,5	0,1	Met = 0,70 Val = 0,30
Met/Val	50	44,1	0,8	
Val/Val	6	9,5	1,3	
Razem (Total)	105	105,1	2,2	1,00



**Ryc. 1.** Schemat rozkładu częstości (%) występowania polimorfizmu w kodonie 129 (Met/Met, Met/Val i Val/Val) w zależności od płci badanych

**Fig. 1.** Distribution of polymorphism frequency (Met/Met, Met/Val, Val/Val) at codon 129 depending on the gender of studied individuals

kaukaskiej stwierdzili, że 54 osoby były heterozygotami, 39 osób było homozygotami dla Met i 13 homozygotami dla Val [13]. Grupa badana w populacji dolnośląskiej była podobna pod względem liczebności, stwierdzono: 50 heterozygot, 49 homozygot dla Met i 6 homozygot dla Val. Niewielkie

różnice w częstości występowania homozygot w obu grupach badanych mogą wynikać z genetycznych różnic populacyjnych.

Polimorfizm nukleotydowy kodonu 129 genu *prnp* kodującego Met lub Val odgrywa rolę w fenotypowej ekspresji różnych chorób prionowych sporadycznych, dziedzicznych oraz jatrogennych [9, 14, 15]. Polimorfizm ten ma wpływ na predyspozycję do zachorowania na formy sporadyczne i infekcyjne CJD [5, 9]. W grupie jatrogennych i sporadycznych form CJD dominuje genotyp homozygotyczny kodonu 129 (Met/Met lub Val/Val) [6]. Collinge i Rossor podali, że w większości jatrogennych i sporadycznych przypadków CJD stwierdzono homozygoty Met/Met w kodonie 129 genu *prnp* [16]. Według Liberskiego et al. [3] w sporadycznych przypadkach CJD (w tym jatrogennych, jak np. zarażenie w wyniku podania leku, np. czynnika wzrostu) w kodonie 129 przeważają allele Met/Met lub Val/Val. Także we wszystkich opisanych przypadkach vCJD stwierdzono homozygotyczność dla Met w kodonie 129, co sugeruje, że u osób tych zachodzi albo zwiększona wrażliwość na wystąpienie, albo krótszy okres inkubacji vCJD [10]. Potwierdzałoby to sugestie Collinge'a et al. [13], że genotypy homozygotyczne Val/Val i Met/Met sprzyjają niestabilności struktury białka prionowego i zmianom konformacyjnym, a genotypy heterozygotyczne stanowią pewną „ochronę” przed jatrogennymi postaciami CJD. Tłumaczyłoby to podatność populacji plemienia Fore na epidemię kuru, w której występuje 50% homozygotyczności Val/Val (około 10% w Europie i USA) [17].

Kodon 129 ma również wpływ na fenotyp rodzinnych form chorób prionowych. Najlepszym przykładem jest determinacja fenotypu choroby rozwijającej się w wyniku mutacji kodonu 178. Mutacja ta może objawiać się klinicznie jako CJD, jeśli jest sprzężona z obecnością waliny w kodonie 129, lub jako FFI, gdy kodon 129 koduje metioninę [14, 18].

Według Kovacs et al. polimorfizm w kodonie 129 ma wpływ na fenotyp w dziedzicznych formach chorób prionowych tak samo jak w niegenetycznych formach i oprócz dodatkowych czynników może być rozważany jako tło fenotypowej zmienności [7]. Montana et al. zaobserwowali różnice w fenotypie FFI zależnie od polimorfizmu w kodonie 129: Met/Met i Met/Val [19]. Schulz-Schaeffer et al. stwierdzili, że pacjenci z CJD będący homozygotami dla waliny byli średnio ponad 5 lat młodszy niż pacjenci będący homozygotami dla metioniny lub heterozygotami w kodonie 129 [20]. Według Parchi et al. korelacja typu PrP z polimorfizmem kodonu 129 *prnp* umożliwiła nową klasyfikację CJD [8].

W wielu badaniach nie stwierdzono prostej zależności między polimorfizmem w kodonie 129 a określonym fenotypem, chociaż w poszczególnych chorobach prionowych polimorfizm ten (sam lub w sprzężeniu z różnymi mutacjami) może modyfikować przebieg choroby. Mimo więc patogenego wpływu tego polimorfizmu, istotne wydaje się oznaczanie go u chorych ze względu na prognozowanie przebiegu choroby, chociaż do tej pory oficjalnie w Polsce niezarejestrowanej, ale możliwej do wystąpienia.

## Piśmiennictwo

- [1] Ostrowski K: Wściekle krowy i inne choroby prionowe a nagroda Nobla 1997 z medycyny. *Post Biol Kom* 1998, 1, 3–8.
- [2] Collinge J: New diagnostic tests for prion diseases. *N Engl J Med* 1996, 335, 963–965.
- [3] Liberski PP, Bratosiewicz J: Pasażowalne amyloidozy mózgowe czyli choroby wywołane przez priony: czy struktura czynnika scrapie jest już rzeczywiście znana? *Post Biochem* 1996, 42, 320–329.
- [4] Nicholl D, Windl O, De Silva R, Sawcer S, Dempster M, Ironside JW, Estibeiro JP, Yuill GM, Lather R, Will RG: Inherited Creutzfeldt-Jakob disease in a British family associated with a novel 144 base pair insertion of the prion protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995, 58, 65–69.
- [5] Bartosiewicz J, Kordek R, Kulczycki J, Botts G, Liberski PP: Molecular analysis of *PRNP* gene in Polish population and in Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol* 1999, 37, 277–280.
- [6] Liberski PP, Bartosiewicz J: Choroby wywołane przez priony i choroba szalonych krów. *Med Praktyczna* 2001, 1, 119–120.
- [7] Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RSG, Budka H: Mutations of the prion protein gene. Phenotypic spectrum. *J Neurol* 2002, 249, 1567–1582.
- [8] Parchi P, Giese A, Brown P, Schultz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999, 46, 224–233.
- [9] Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, Collins S, Kretzschmar H, van Du-jin C, Will RG: Codon 129 protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999, 353, 1673–1674.
- [10] Grams R, Bartosiewicz-Wąsik J, Liberski PP: Nowy wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba i choroby wywołane przez priony – problem globalnego zagrożenia. *Red. Leszek J. Choroby ośpienie. Teoria i praktyka. Continuo ed.1, Wrocław 2003, 199–241.*



- [11] **Bartosiewicz J, Liberski PP, Kulczycki J, Kordek R:** Codon 129 polymorphism of the *PRNP* gene in normal Polish population and in Creutzfeldt-Jakob disease, and the search for new mutations in *PRNP* gene. *Acta Neurobiol Exp* 2001, 61, 151–156.
- [12] **Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP:** Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999, 97, 355–358.
- [13] **Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ:** Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1991, 337, 1441–1442.
- [14] **Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Wils PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Auti-llo-Gambetti L, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P:** Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992, 258, 806–808.
- [15] **Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN, Mackenzie J, Estibeiro K, Green AJ, Knight RS:** Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000, 47, 575–582.
- [16] **Collinge J, Rossor M:** A new variant of prion disease. *Lancet* 1996, 347, 916–917.
- [17] **Liberski PP:** Współczesne poglądy na patologię molekularną pasażowalnych amyloidów mózgowych. Sesja PTNW, Warszawa 1995.
- [18] **Harder A, Jendroska K, Kreuz F, Wirth T, Chafranka C, Karnatz N, Theallier-Janko A, Dreier J, Lohan K, Emmerich D, Cervos-Navarro J, Windl O, Kretzschmar HA, Nurnberg P, Witkowski R:** Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet* 1999, 87, 311–316.
- [19] **Montagna P, Cortelli P, Avoni P, Tinuper P, Plazzi G, Gallassi R, Poratluppi F, Julien J, Vital C, Delisle MB, Gambetti P, Lugaresi E:** Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol* 1998, 8, 515–520.
- [20] **Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Windl O, Kretzschmar HA:** Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene determines cerebellar pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neuropathol* 1996, 15, 353–357.

### Adres do korespondencji:

Agnieszka Stembalska  
Zakład Genetyki Katedry Patofizjologii AM  
ul. Marcinkowskiego 1  
50-368 Wrocław  
agnes@gen.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 7.10.2004 r.

Po recenzji: 27.01.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 16.02.2005 r.

Received: 7.10.2004

Revised: 27.01.2005

Accepted: 16.02.2005