

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



mgr Małgorzata Grzegorzczak

**Analiza związku polimorfizmu insercyjno/delecyjnego
promotora genu *PPP3R1* kodującego kalcyneurynę B z masą
lewej komory serca.**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Ciechanowicz

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej i Molekularnej PUM

Szczecin 2023 r.

Szczecin, dnia.....

OŚWIADCZENIE

autora o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Ja, niżej podpisana Małgorzata Grzegorzczuk uczestniczka Studiów Doktoranckich w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie niniejszym przedkładam moją rozprawę doktorską pt.: „Analiza związku polimorfizmu insercyjno/delecyjnego promotora genu *PPP3R1* kodującego kalcyneurynę B z masą lewej komory serca” oraz oświadczam, że przedkładaną rozprawę doktorską napisałam samodzielnie. Oznacza to, że przy pisaniu pracy poza niezbędnymi konsultacjami nie korzystałam z pomocy innych osób, a w szczególności nie zleciłam opracowania rozprawy lub jej części innym osobom, ani nie odpisałam tej rozprawy lub jej części z innych źródeł. Ponadto cytaty z obcych prac zostały wyczerpująco oznaczone oraz wskazane w przypisach i bibliografii mojej pracy. Przedkładana rozprawa nie narusza przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tekst jednolity z dnia 17 maja 2006 r. Dz. U. nr 90, poz. 631) również w inny sposób.

podpis

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska przygotowana została pod opieką Pana prof. dr hab. n. med. Andrzeja Ciechanowicza, któremu dziękuję za okazaną pomoc, cenne uwagi i sugestie, które wpłynęły na ostateczny kształt tej pracy, jak również za zaangażowanie i życzliwość okazane mi podczas kilkuletniej opieki naukowej w trakcie studiów doktoranckich.

Pragnę podziękować wszystkim moim współpracownikom z Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej PUM za wielkie wsparcie w trakcie studiów i wiarę w moje możliwości.

W szczególny sposób pragnę podziękować moim rodzicom oraz mojemu mężowi Michałowi za ogromne wsparcie i możliwość dalszego kształcenia.

Małgorzata Grzegorzcyk

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów i symboli	5
Wykaz tabel	7
Wykaz rycin.....	8
Wprowadzenie	9
1.1. Rozwój serca	9
1.2. Kalcyneuryna.....	11
1.3. Polimorfizm genu <i>PPP3R1</i>	15
2. Cele pracy.....	17
3. Materiał i metody	18
3.1. Noworodki.....	18
3.2. Identyfikacja polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu <i>PPP3R1</i>	19
3.3. Analiza statystyczna	22
4. Wyniki	23
5. Dyskusja	32
6. Wnioski.....	41
7. Streszczenie w języku polskim.....	42
8. Streszczenie w języku angielskim	44
9. Piśmiennictwo	46
10. Aneks.....	54

Wykaz najważniejszych skrótów i symboli

BL	ang. Body Length – długość ciała
BSA	ang. Body Surface Area – parametr powierzchni ciała
BW	ang. Birth Weight – masa urodzeniowa
CaM	ang. Calcium-Modulated protein – Kalmodulina
Cn/CaN	ang. Calcineurin – Kalcyneuryna
CnA	Podjednostka A kalcyneuryny
CnB	Podjednostka B kalcyneuryny
DNA	ang. Deoxyribonucleic Acid – kwas deoksyrybonukleinowy
GWAS	ang. Genome-Wide Association Studies – badanie asocjacyjne całego genomu
HWE	ang. Hardy-Weinberg Equilibrium – Prawo (równowaga) Hardy'ego-Weinberga
IVST	ang. Interventricular Septal Thickness- grubość przegrody międzykomorowej
LVID	ang. Left Ventricular Internal Diameter – średnica wewnętrzna lewej komory serca
LVH	ang. Left Ventricular Hypertrophy – przerost mięśnia lewej komory serca
LVM	ang. Left Ventricular Mass – masa lewej komory
LVMI	ang. Left Ventricular Mass Index – wskaźnik masy lewej komory serca
LVPWT	ang. Left Ventricular Posterior Wall Thickness - grubość tylnej ściany lewej komory serca
NFAT	ang. Nuclear Factor of Activated T-cells – Czynn timer jądrowy aktywowanych komórek T
PCR	ang. Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy

<i>PPP3R1</i>	ang. Protein Phosphatase 3 Regulatory subunit B, alpha (1) – gen podjednostki regulatorowej B (izoformy alfa lub izoformy 1) fosfatazy białkowej 3
RFLP	ang. Restriction Fragments Length Polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Wykaz tabel

Tabela 1. Analiza normalności rozkładu badanych zmiennych ilościowych.....	28
Tabela 2. Charakterystyka badanych noworodków w zależności od płci.....	29
Tabela 3. Charakterystyka badanych noworodków w zależności od polimorfizmu <i>PPP3R1</i>	30
Tabela 4. Dolny i górny tertyl wskaźników masy serca noworodków w zależności od polimorfizmu <i>PPP3R1</i>	31
Tabela 5. Częstość allelu 5D <i>PPP3R1</i> w populacjach z projektu 1000 Genomów	35

Wykaz rycin

Rycina 1. Mechanizm częściowej i pełnej aktywacji kalcyneuryny	13
Rycina 2. Identyfikacja polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu <i>PPP3R1</i> metodą PCR-RFLP.....	23
Rycina 3. Chromatogram sekwencyjny homozygoty 5I/5I genu <i>PPP3R1</i>	24
Rycina 4. Chromatogram sekwencyjny heterozygoty 5I/5D genu <i>PPP3R1</i>	25
Rycina 5. Chromatogram sekwencyjny homozygoty 5D/5D genu <i>PPP3R1</i>	26

Wprowadzenie

1.1.Rozwój serca

Serce ssaków jest zmodyfikowanym naczyniem, które w trakcie rozwoju embrionalnego rozwija się od etapu prostej rurki (cewy) mięśniowej z wyściółką wsierdzia do stadium organu będącego podwójną pompą pozostającą pod stałą kontrolą elektryczną i neuroendokrynną. Kluczową cechą rozwoju serca ssaków jest przegrodzenie pojedynczej cylindrycznej cewy w celu utworzenia czterech przedziałów o różnych rolach i przeznaczeniu tj. dwóch przedziałów zbierających krew (przedsionki) i dwóch przedziałów, które tę krew pompują (komory). Rozwój serca płodu jest złożonym i dynamicznym procesem pozostającym pod kontrolą sieci licznych i jeszcze nie do końca poznanych czynników, wśród których bardzo istotną rolę odgrywają „sercowe” czynniki transkrypcyjne, w tym GATA4/6, ISL1, NKX2-5, MEF2C, SRF, TBX5 i TBX20 (1).

Rozwój serca człowieka rozpoczyna się w trakcie gastrulacji pod koniec drugiego tygodnia po zapłodnieniu, równoległe z tworzeniem krwi oraz naczyń krwionośnych. Stąd też na początku czwartego tygodnia rozwoju cewa sercowa wypełnia się płynem i zaczyna się kurczyć (2,3). Rozrasta się ona także na długość oraz wygina w kształt litery S, a następnie litery U (tzw. „cardiac looping”). W fizjologicznym rozwoju skręt cewy sercowej wokół własnej osi zachodzi w prawo (dzięki temu ostatecznie koniuszek serca ułoży się w worku osierdziowym po lewej stronie). W górnej części cewy sercowej znajdują się pień tętniczy i uszka przedsionków, natomiast jej część dolną stanowi komora pierwotna. Między czwartym a piątym tygodniem życia płodowego (zarodek ma wtedy ok. 5-6 mm długości) dokonują się podziały wewnętrznych fałdów wsierdzia. I tak w części górnej tworzy się przegroda pierwotna (pierwsza) zamykająca stopniowo otwór pierwszy, a następnie górna jej część na skutek zaniku tworzy otwór wtórny, która umożliwia zgodny z gradientem ciśnienia przepływ krwi z prawego do lewego

przedsionka. Po narodzinach ciśnienie w lewym przedsionku wzrasta, prowadząc do zamknięcia (początkowo czynnościowego, a następnie anatomicznego) przepływu krwi z prawego przedsionka. Z kolei, przegrodę pierwotnej komory tworzy wyrastająca ku górze wypustka fałdu mięśniowego znajdującego się w jej dnie. Pomiędzy jej górną częścią i środkiem pierwotnej cewy sercowej tworzy się otwór łączący tak utworzone dwie komory. Otwór ten zostaje w kolejnym etapie rozwoju osłonięty błoniastą blaszką. Złączenie się tej blaszki z przegrodą mięśniową i zamknięcie połączenia między komorami serca następuje około 7 tygodnia życia płodowego. Do 35 dnia od zapłodnienia rozwój serca zarodka uważany jest za zakończony, a dalsze zmiany w sercu po zakończeniu organogenezy polegają głównie na rozroście (hiperplazji) miocytów (2). Natomiast u niemowląt zachodzi zarówno rozrost (do 6 miesiąca po urodzeniu utrzymuje się aktywność mitotyczna kardiomiocytów i ich potencjalna zdolność do rozrostu), jak i przerost (hipertrofia) kardiomiocytów. Po tym czasie wszystkie miocyty serca stają się komórkami ostatecznie zróżnicowanymi zachowując jednak zdolność do przerostu m.in. w odpowiedzi na zwiększającą się objętość krwi krążącej. Przerost miocytów charakteryzuje się ich wydłużeniem i pogrubieniem, co może przełożyć się nawet na 30-40-krotne zwiększenie ich objętości w czasie rozwoju postnatalnego i dojrzewania (2).

Zmiany stężenia jonów wapnia w cytoplazmie miocytów odgrywają kluczową rolę w regulacji m.in. ich kurczliwości i apoptozy. Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} regulują również ekspresję genów i/lub aktywność produktów tych genów zaangażowanych w przerost kardiomiocytów (4,5). Głównym „sensorem” tych zmian stężenia jonów wapnia jest kalmodulina (CaM). Białko to po przyłączeniu Ca^{2+} aktywuje szereg enzymów powiązanych ze ścieżkami sygnalizacji komórki, takich jak kinazy i fosfatazy białkowe, fosfolipazy, syntaza tlenku azotu oraz endonukleazy. Trzy

najważniejsze dla funkcji miocytów serca enzymy aktywowane w tym mechanizmie to: kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (CaMK), kinaza lekkiego łańcucha miozyny (MLCK) i kalcyneuryna (CaN) (4,6).

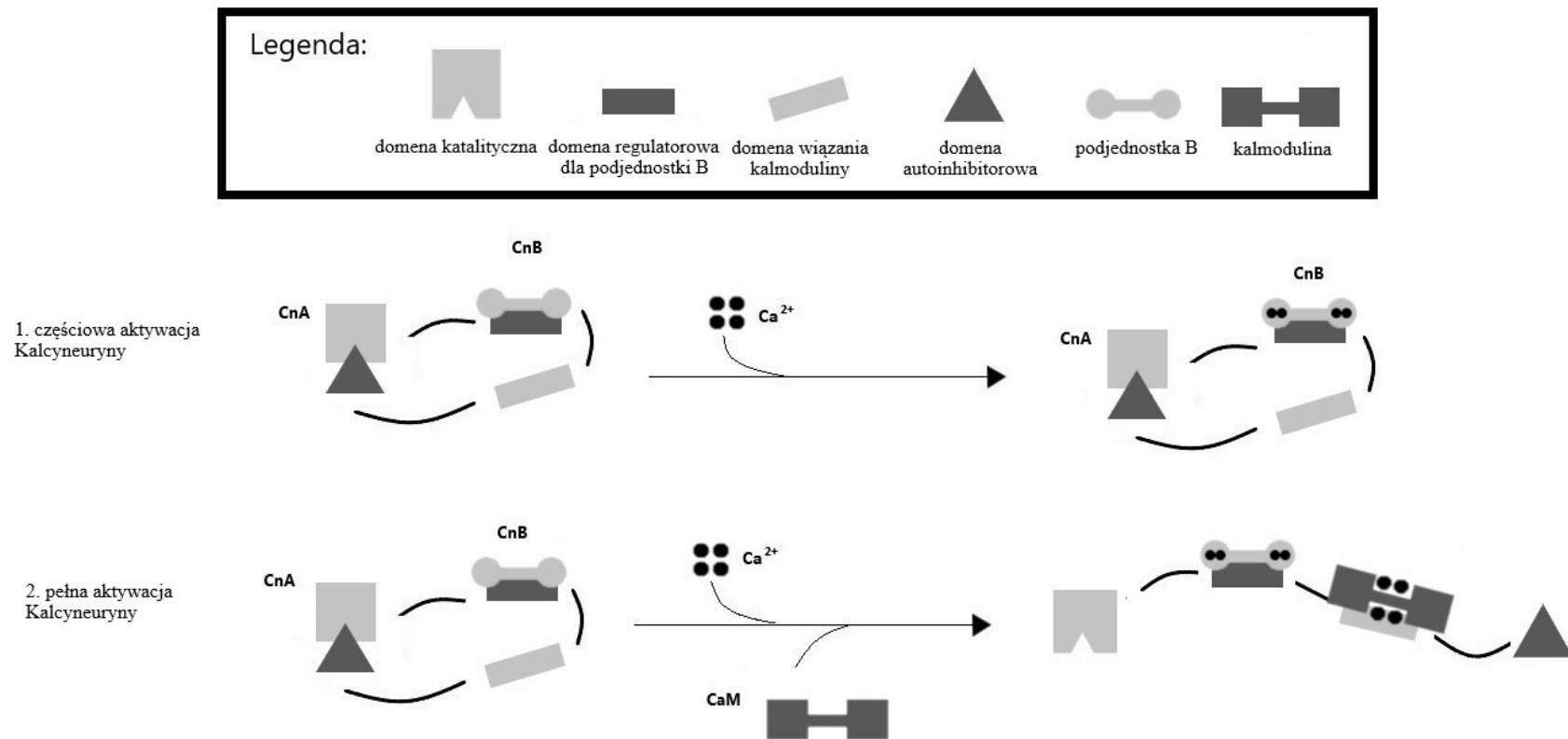
1.2.Kalcyneuryna

Kalcyneuryna (CaN) jest zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny fosfatazą serynowo/treoninową, która ulega aktywacji przy zwiększeniu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. CaN jest enzymem występującym w kardiomiocytach i w komórkach mięśni szkieletowych, a także m.in. w limfocytach i neuronach oraz wykrywanym w płucach, w śledzionie i w wątrobie. Jej struktura jest bardzo konserwatywna, z dużym stopniem homologii między gatunkami, zarówno na poziomie nukleotydów, jak i aminokwasów (6,7).

Kalcyneuryna jest heterodimerem złożonym z katalitycznej podjednostki A (CnA) o masie 60 kDa i regulatorowej podjednostki B (CnB) o masie 19 kDa. CnA oprócz domeny katalitycznej (aminokwasy od pozycji 71 do 342) ma również domenę regulatorową dla podjednostki B (aminokwasy od pozycji 348 do 370), domenę wiążącą kalmodulinę (aminokwasy od pozycji 391 do 414) i domenę autoinhibitorową (aminokwasy od pozycji 457 do 482) (7–9). Konstytutywna aktywacja CnA następuje poprzez usunięcie dwóch ostatnich domen, co zachodzi niezależnie od sygnalizacji związanej z wewnątrzkomórkowym Ca^{2+} (10). Podjednostka regulatorowa CaN wykazuje strukturalną homologię z kalmoduliną (oba te białka są zależne od Ca^{2+}). CnB, która bierze udział w aktywacji CnA, ma dwa płaty wiążące Ca^{2+} połączone krótkim łącznikiem zawierającym cztery tzw. motywy ręki EF (EF-hands motifs) (aminokwasy od pozycji 22 do 50, od 54 do 82, od 91 do 119 i 132 do 160 w łańcuchu polipeptydowym CnB) (7,8,10,11).

Obecnie znane są trzy izoformy podjednostki katalitycznej kalcyneuryny: CnAa, CnAb i CnAg oraz dwie izoformy podjednostki regulatorowej CaN tj. CnB1 i CnB2 (10). Warto zaznaczyć, że CnAa i CnAb wykazują aż 81% podobieństwa (11), a różni je głównie związana z rozpoznawaniem substratu powtarzająca się sekwencja proliny na końcu N izoformy CnAb. Z kolei, sekwencje CnB1 i CnB2 mają aż 83% homologii (7).

Natywna forma CaN jest nieaktywna enzymatycznie, a analiza jej struktury krystalicznej ujawnia zablokowanie centrum katalitycznego przez domenę autoinhibitorową. W sytuacji zwiększenia stężenia jonów wapnia w cytoplazmie dochodzi do ich związania z CnB, co powoduje oddzielenie domeny wiążącej kalmodulinę od domeny regulatorowej dla podjednostki B. Następnie, kalmodulina łączy się z domeną wiążącą kalmodulinę powodując przemieszczenie domeny autoinhibitorowej z centrum katalitycznego, co skutecznie aktywuje kalcyneurynę. Przy braku kalmoduliny, samo zwiększone stężenie jonów wapnia w cytozolu prowadzi do ich związania z CnB, prowadząc do częściowej aktywacji kalcyneuryny (Rycina 1) (6).



Rycina 1. Mechanizm częściowej i pełnej aktywacji kalcyneuryny (6).

Po aktywacji kalcyneuryna katalizuje defosforylację wielu docelowych substratów, w tym m.in. różnych czynników transkrypcyjnych i receptorów. Dla przykładu, pierwsza poznana oś sygnalizacyjna kalcyneuryna-NFAT została odkryta jako kluczowa ścieżka aktywacji limfocytów T (12), ale obecnie wiadomo już, iż jest ona zaangażowana w wiele procesów komórkowych w różnych typach komórek u rozmaitych gatunków, od roślin do człowieka (13). U człowieka szlak sygnalizacyjny CaN poprzez regulację różnych procesów komórkowych bierze udział w procesie rozwoju embrionalnego nie tylko serca, ale także nerek, mięśni szkieletowych, układu immunologicznego i układu nerwowego oraz w procesie różnicowania m.in. mięśni, skóry, kości, chrząstek i tkanki tłuszczowej (6). Wskazuje się również, że w sercu, oprócz tej funkcji, sygnalizacja za pośrednictwem kalcyneuryny jest także wspólnym dla wielu czynników (w tym patogennych) szlakiem wewnątrzkomórkowym prowadzącym do przerostu mięśnia sercowego i jego przebudowy (14). Rola kalcyneuryny jako kluczowego mediatora przerostu miocytów, sprowadza się głównie do regulowania przez tę fosfatazę aktywności zależnych od niej czynników transkrypcyjnych, w tym m.in. NFAT, MEF2, GATA4, NF- κ B i Drp1, jak również innych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, w tym ścieżki Wnt oraz ścieżek powiązanych z kinazą białkową C (PKC), z kinazą białkową aktywowaną mitogenem (MAPK), z kinazą białkową zależną od kalmoduliny II (CaMKII) lub z 3-kinazą fosfatydylinozytolu (6). Warto wspomnieć, że u myszy transgenicznych konstytutywna aktywacja kalcyneuryny lub zwiększona ekspresja aktywowanej przez CaN formy NFAT indukują przerost mięśnia sercowego prowadzący do niewydolności serca w ciągu pierwszych tygodni życia (15). Z drugiej strony, wykazano także, iż delecja genu dla CnB1 w kardiomiocytach zapobiega indukowanej przez angiotensynę II niewydolności serca m.in. poprzez redukcję masy mięśnia sercowego oraz zmniejszenie pole przekroju poprzecznego kardiomiocytów i grubości ściany lewej komory. Stwierdzono również, że konstytutywny niedobór podjednostki katalitycznej CnAb,

a także NFATc2 lub NFATc3 zmniejszają indukowany przez angiotensynę II przyrost masy serca (16). Z kolei, wyniki doświadczeń zogniskowanych na genetycznym (zwiększona ekspresja endogennych inhibitorów kalcyneuryny) lub farmakologicznym hamowaniu sygnalizacji zależnej od kalcyneuryny wskazują, że działania te zmniejszają stopień przerostu i dysfunkcji mięśnia sercowego (13,17,18).

1.3. Polimorfizm genu *PPP3R1*

Położony na chromosomie 2p14 gen *PPP3R1* koduje podjednostkę regulatorową B1 kalcyneuryny (CnB1). W 2005 roku Tang i wsp. odkryli w promotorze genu *PPP3R1* nowy polimorfizm insercyjno-delecyjny polegający na obecności (allel 5I) lub braku (allel 5D) pięciu nukleotydów (TTTAA) w pozycji od -1063 do -1059 od miejsca inicjacji transkrypcji (19). Autorzy ci analizowali również związek tego polimorfizmu z przerostem lewej komory serca u 368 pacjentów (53% badanej grupy stanowili Afroamerykanie) z projektu Hypertension Genetic Epidemiology Network. I chociaż w badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy polimorfizmem 5I/5D *PPP3R1* i przerostem mięśnia sercowego zdefiniowanym arbitralnie jako $LVM/wzrost^{2.7} > 47$ (g/m^{2.7}) u kobiet i $LVM/wzrost^{2.7} > 50$ (g/m^{2.7}) u mężczyzn, to odkryto, że polimorfizm 5I/5D był związany z „niewłaściwie dużą masą lewej komory (inappropriately high LV mass) definiowaną jako większy niż 128% iloraz rzeczywistej i oczekiwanej masy lewej komory. Związek ten był niezależny od wieku, płci, wskaźnika masy ciała, częstości akcji serca, choroby niedokrwiennej serca, cukrzycy oraz stosowanych leków hipotensyjnych (19).

Trzy lata później Akhmetov i wsp. na podstawie badań przeprowadzonych w kohorcie 673 dorosłych Rosjan uprawiających wyczynowo sport stwierdzili, że zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn allel 5D był związany z większym wskaźnikiem masy lewej komory serca (LVMI, Left Ventricular Mass Index) (20).

W 2017 roku Maddhuri i wsp. wykazali u Hindusów związek allelu delecyjnego *PPP3R1* z predyspozycją do choroby wieńcowej, a także z podwyższonym stężeniem kalcyneuryny w surowicy (21). Z kolei, rok później Cao i wsp. odkryli u Chińczyków z nadciśnieniem tętniczym dodatnią korelację pomiędzy aktywnością (ale nie stężeniem) kalcyneuryny w surowicy i przerostem mięśnia sercowego (22).

2. Cele pracy

Na podstawie powyższych przesłanek wyznaczono następujące cele pracy:

1. Opracowanie metody PCR-RFLP identyfikacji polimorfizmu insercyjno/delecyjnego promotora genu *PPP3R1*.
2. Ocena rozpowszechnienia polimorfizmu insercyjno/delecyjnego promotora genu *PPP3R1* w grupie zdrowych noworodków urodzonych o czasie.
3. Analiza związku pomiędzy polimorfizmem insercyjno/delecyjnym promotora genu *PPP3R1* i masą lewej komory serca u zdrowych donoszonych noworodków.

3. Materiał i metody

3.1. Noworodki

Materiał do badań stanowiły próbki genomowego DNA z krwi pępowinowej 162 zdrowych noworodków (71 dziewczynek i 91 chłopców), urodzonych po zakończeniu 37 tygodnia ciąży (od 38 do 40 tygodnia). Próbkę DNA zostały w sposób losowy wybrane z banku DNA noworodków Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej PUM. To repozytorium próbek DNA zostało utworzone w roku 2005 w ramach współpracy naukowej z Kliniką Patologii Noworodka PUM (projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, uchwała nr BN-001/57/05 z dnia 21.02.2005 r.). Do projektu włączono próbki wyłącznie od noworodków, u których dostępne były podstawowe dane kliniczne tj. płeć, masa urodzeniowa (BW) i długość ciała (BL) oraz wskaźniki oceny ultrasonograficznej serca w trzeciej dobie po urodzeniu (kryteria włączenia). Natomiast kryteria wyłączenia obejmowały: ciążę mnogą, cukrzycę ciążową, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (ang. Intrauterine Growth Retardation, IUGR), aberracje chromosomowe i/lub wady wrodzone. Dla każdego noworodka obliczono powierzchnię ciała (BSA, Body Surface Area) stosując wzór Mostellera (23):

$$BSA (m^2) = 0.01666667 \times BL (cm)^{0.5} \times BW (kg)^{0.5}$$

Ocena ultrasonograficzna serca została wykonana u każdego noworodka w 3. dobie po porodzie przez tego samego kardiologa dziecięcego aparatem Acuson Sequoia 512 (USA), wyposażonym w głowicę obrazującą 2–4 MHz według protokołu szczegółowo opisanego we wcześniejszych artykułach naszego zespołu badawczego (24–27).

Masę lewej komory serca (LVM) obliczono na podstawie echokardiograficznej oceny wymiarów lewej komory stosując tzw. Penn Convention Protocol z równaniem zmodyfikowanym przez Huwez i wsp. (28) w następujący sposób:

$$LVM [g] = 1.04[(IVST+LVPWT+LVID)^3 - LVID^3]$$

gdzie: IVST – końcoworozkurczowa grubość przegrody międzykomorowej (w mm)

LVPWT – końcoworozkurczowa grubość tylnej ściany lewej komory (w mm)

LVID – końcoworozkurczowy wymiar wewnętrzny lewej komory (w mm)

Wyliczone wartości LVM (g) były następnie standaryzowane względem masy urodzeniowej (BW, kg), względem długości ciała (BL, m) oraz względem powierzchni ciała (BSA, m²) i wyrażane w postaci wskaźników, odpowiednio: LVM/BW, LVM/BL i LVM/BSA.

3.2. Identyfikacja polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu *PPP3R1*

Polimorfizm 5I/5D genu *PPP3R1* identyfikowano metodą PCR-RFLP (ang. Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), a wyniki uzyskane tą metodą były sprawdzone poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych 16 (10%) próbek DNA. Startery do łańcuchowej reakcji polimerazy zostały zaprojektowane przy pomocy oprogramowania PrimerSelect DNASTAR® Lasergene v8.0 (DNASTar) na podstawie sekwencji NC_000002.12 (*Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p12 Primary Assembly*) pochodzącej z bazy NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Startery te zostały zsyntetyzowane przez firmę TIB MOLBIOL (Poznań, Polska), a pozostałe odczynniki do PCR pochodziły z firmy MBI Fermentas (Litwa). W amplifikacji metodą PCR fragmentu genu *PPP3R1* obejmującego polimorfizm insercyjno/delecyjny starterem sensownym był oligonukleotyd: 5'-GAGTTT AAAAGCCAGCCAGTCAT-3', a antysensownym: 5'-AAAACAGTAATATCTCAA GTAGTA-3'.

Poprzez zastosowanie tej pary starterów uzyskano ampikon o długości 304 par zasad (pz) dla allelu 5I, a dla allelu 5D ampikon o długości 299 pz.

Skład mieszaniny do PCR był następujący (objętość = 20 µl):

- 2 µl DNA (80 ng)
- 10 µl 2x PCR Master Mix
- 0,2 µl startera sensownego [20 pmol/µl]
- 0,2 µl startera antysensownego [20 pmol/µl]
- 7,6 µl H₂O

Zoptymalizowany we wstępnych doświadczeniach profil temperaturowo-czasowy PCR w aparacie Mastercycler Pro S (Eppendorf) był następujący:

- początkowa denaturacja: 94°C - 5 min.
- 38 cykli: 94°C – 20 s, 53°C – 40 s, 72°C – 40s
- końcowa elongacja: 72°C – 10 min

Otrzymane produkty PCR poddano inkubacji w temp. 37°C przez 24h z enzymem restrykcyjnym VspI (*AseI*) (10 U/µL) (Fisher Thermo Scientific™).

Mieszanina reakcyjna zawierała:

- 8,0 µl produktu PCR,
- 0,5 µl enzymu restrykcyjnego VspI (*AseI*) (10 U/µL) (Fisher Thermo Scientific™)
- 1,0 µl Bufor O (Fisher Thermo Scientific™).

Produkty PCR po trawieniu enzymem restrykcyjnym rozdzielano elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym z barwnikiem Midori Green (Nippon). Rozdział ten prowadzono w buforze 1xTBE (0,089 M Tris, 0,089 M kwas borowy, 2 mM EDTA), w temp. 20°C, przy napięciu 75V. Długości fragmentów restrykcyjnych określano w oparciu o marker długości DNA – pUC Mix Marker 8 (MBI Fermentas). Kończącym etapem PCR-RFLP była dokumentacja rozdziału w żelu agarozowym przy pomocy zestawu G:BOX BioImaging System (SYNGENE). Poprawność identyfikacji genotypów *PPP3R1* metodą PCR-RFLP oceniano poprzez sekwencjonowanie losowo

wybranych 16 spośród 162 (10%) analizowanych próbek genomowego DNA. W tym celu na wstępie poddano je amplifikacji metodą PCR według protokołu opisanego powyżej, a następnie otrzymane produkty PCR oczyszczono z nadmiaru nukleotydów i starterów w następujący sposób:

Do 5 μ l produktu PCR dodawano:

- 0,5 μ l enzymu Exonuclease I (10U)
- 1 μ l FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1U) (Applied Biosystems, USA).

Próbki te inkubowano w termocyklerze w 37°C przez 15 min., a następnie przez kolejne 15 min. w 85°C.

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono w oparciu o odczynniki z zestawu BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), a mieszanina reakcyjna (10 μ l) zawierała:

- 2 μ l Terminator Ready Reaction Mix,
- 1 μ l Sequencing Buffer,
- 1,6 μ l startera [20 pmol/ μ l],
- 4,4 μ l H₂O wolnej od nukleaz
- 1 μ l produktu PCR.

Protokół tej reakcji przeprowadzonej w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) obejmował wstępną inkubację w temp. 96°C przez 1 minutę, a następnie: 25 cykli: 96°C przez 10s, 50°C przez 5s, 60°C przez 4 minuty. Otrzymane produkty reakcji oczyszczono metodą EtOH/NaOAc w następujący sposób: do każdej próbówki z jej produktami dodawano 26 μ l roztworu EtOH/NaOAc (1 μ l 3M NaOAc, pH 5.2, 25 μ l 99,9% EtOH), a następnie po wymieszaniu zawartości próbówki wirowano ją przez 20 min. (5305xg) w wirówce Centrifuge 5415 D (Eppendorf), potem po usunięciu roztworu do próbówek dodano 75 μ l 70% EtOH i wirowano je przez 5 min. (5305xg),

a po delikatnym usunięciu roztworu odwróconą probówkę ponownie wirowano przez 1 min. przy obrotach 1326xg. Do tak oczyszczonych produktów dodawano 10 μ l dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems).

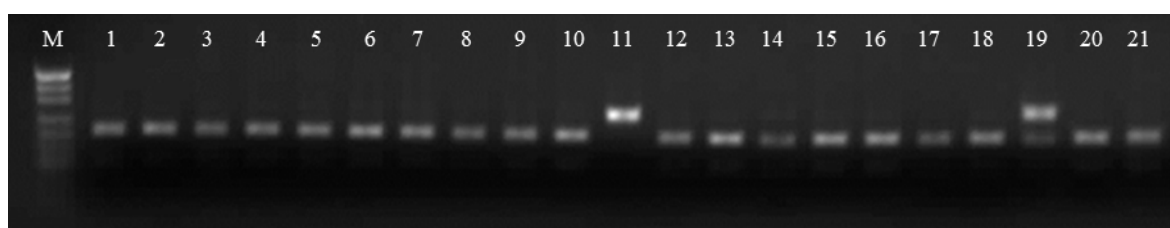
Analizę sekwencji wybranego fragmentu przeprowadzano w aparacie ABI PRISM® 3130 (Applied Biosystems), a jej wyniki odczytywano przy pomocy oprogramowania Sequencing Analysis v5.1 (Applied Biosystems).

3.3. Analiza statystyczna

Wartości zmiennych ilościowych przedstawiono w postaci mediany podając również wartość minimalną i maksymalną, a zgodność rozkładu tych zmiennych z rozkładem normalnym oceniano za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa i testu Lillieforsa. Porównanie tych zmiennych pomiędzy grupą noworodków płci żeńskiej i grupą noworodków płci męskiej oraz pomiędzy grupami noworodków o różnych genotypach *PPP3R1* przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitney'a. Za pomocą testu χ^2 przeprowadzono ocenę zgodności rozkładu genotypów polimorfizmu 5I/5D genu *PPP3R1* (rs3039851) z prawem Hardy'ego-Weinberga (HWE, ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*) zarówno w całej badanej grupie, jak i odrębnie każdej z płci. Test ten zastosowano również przy porównaniu rozkładów częstości genotypów i alleli polimorfizmu rs3039851 u noworodków płci żeńskiej z jego rozkładami u noworodków płci męskiej, a także w porównaniu rozkładu częstości genotypów *PPP3R1*: rs3039851 pomiędzy noworodkami o największych (górny tertyl) i najmniejszych (dolny tertyl) wartościach wskaźników masy lewej komory serca. Analizy statystyczne zostały przeprowadzone w programie STATISTICA (Dell Inc. 2016, wersja 13). Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$.

4. Wyniki

Polimorfizm 5I/5D *PPP3R1* identyfikowano metodą PCR-RFLP. Dla każdej z 162 próbek genomowego DNA badanych noworodków uzyskano amplikony dobrej jakości pozwalające na jednoznaczną identyfikację genotypów polimorfizmu 5I/5D genu *PPP3R1* (Rycina 2). Sekwencjonowanie losowo wybranych 16 spośród 162 próbek DNA wykazało pełną zgodność z wynikami identyfikacji polimorfizmu *PPP3R1* przeprowadzonej metodą PCR-RFLP (Ryciny 3-5).



Rycina 2. Identyfikacja polimorfizmu insercyjno/delecyjnego genu *PPP3R1* metodą PCR-RFLP

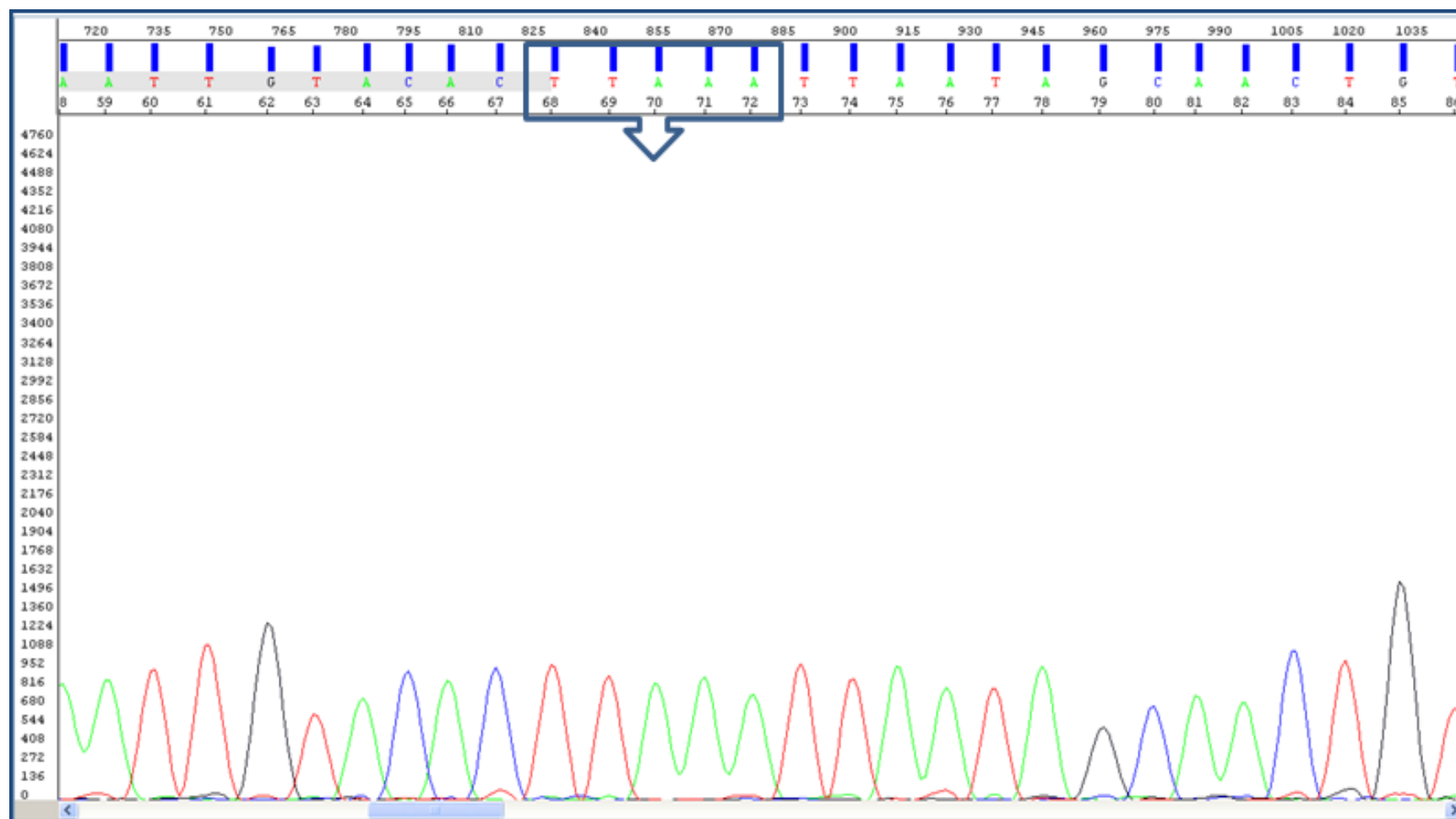
Ścieżki:

M - marker długości DNA - pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 [MBI Fermentas]

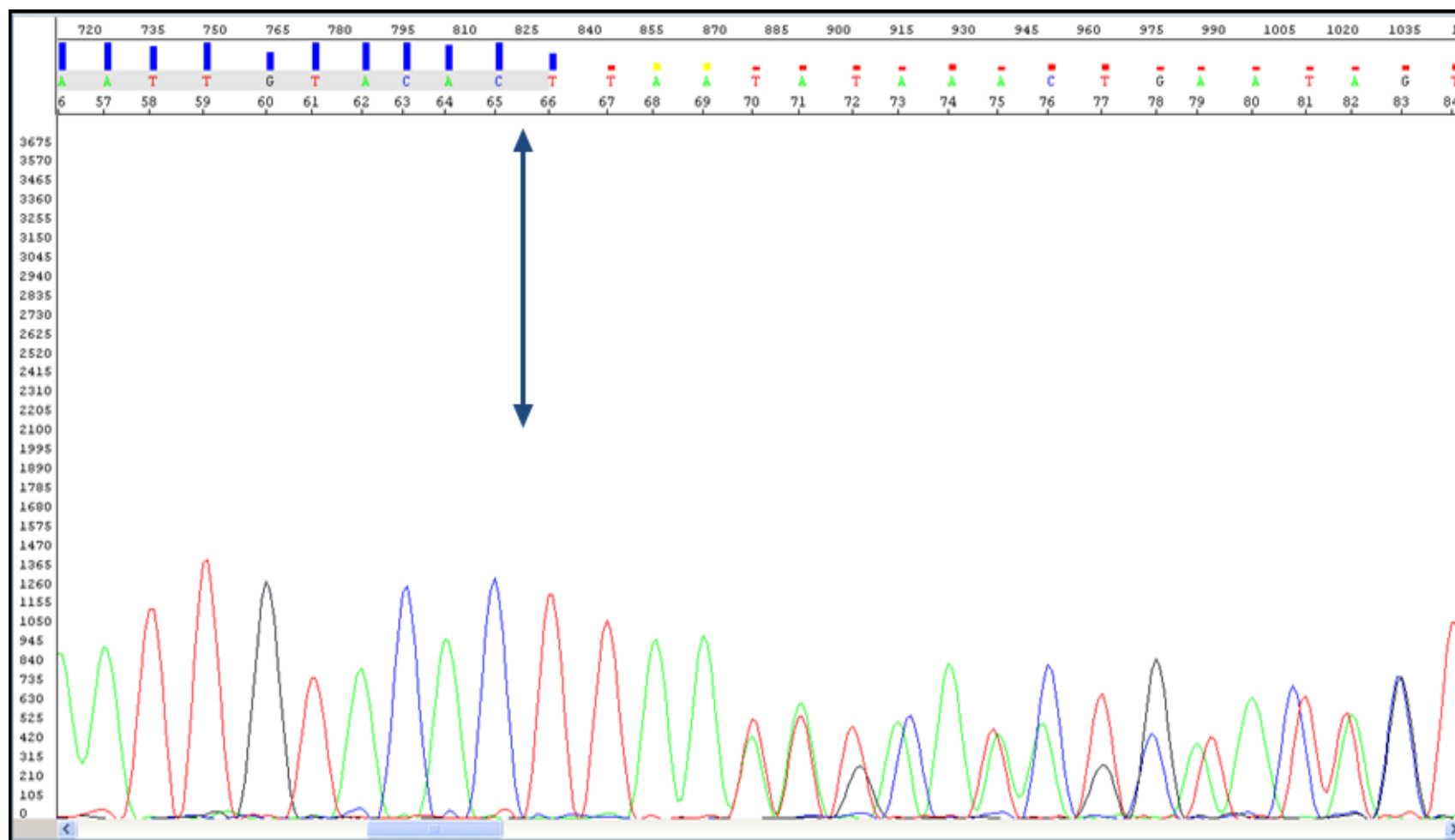
1-10, 12-18, 20-21 – genotyp 5I/5I (fragmenty restrykcyjne: 201pz + 103pz)

11 - genotyp 5D/5D (fragmenty restrykcyjne: 299pz)

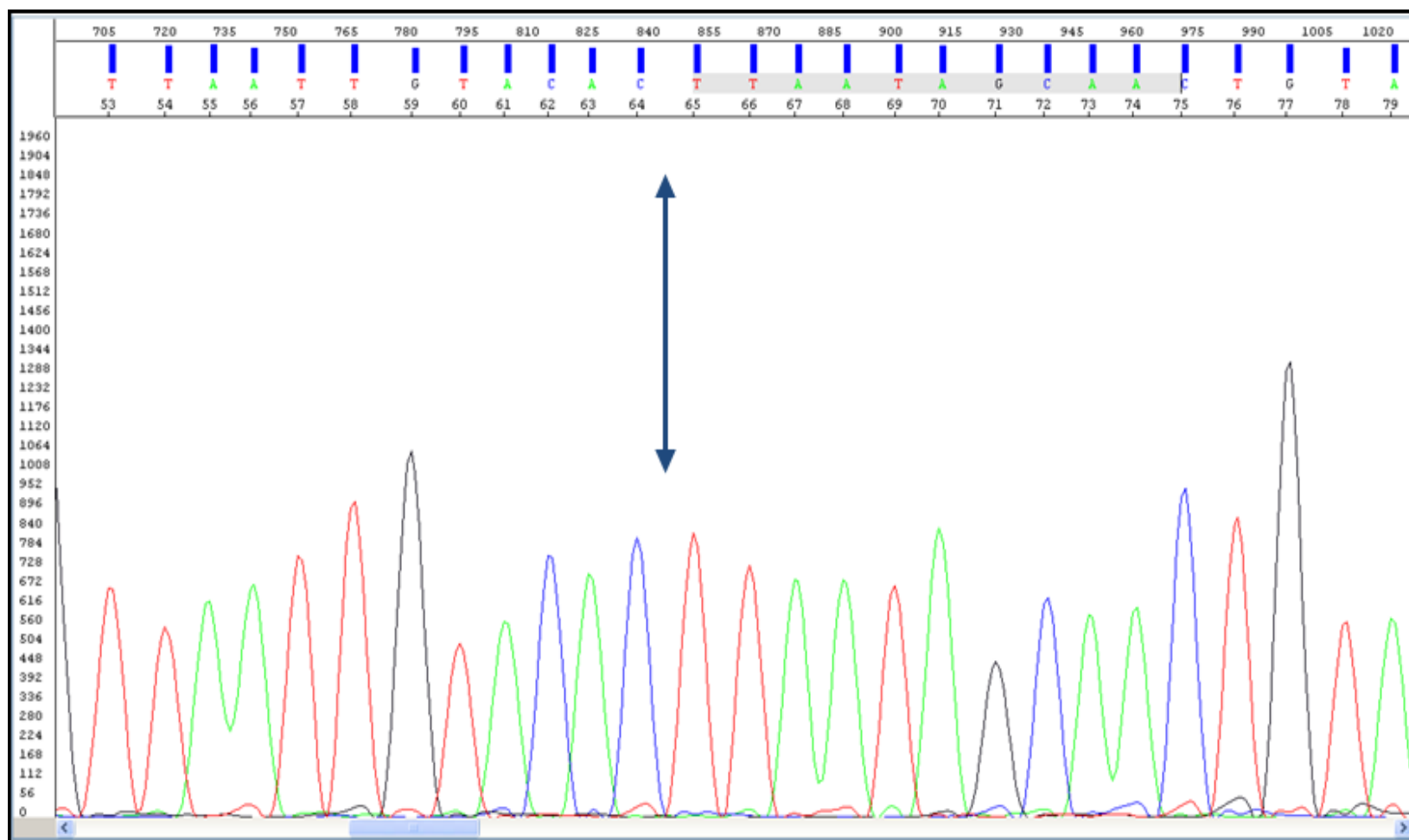
19 – genotyp 5I/5D (fragmenty restrykcyjne: 299pz + 201pz + 103pz)



Rycina 3. Chromatogram sekwencyjny homozygoty 5I/5I genu *PPP3R1*



Rycina 4. Chromatogram sekwencyjny heterozygoty 5I/5D genu PPP3R1



Rycina 5. Chromatogram sekwencyjny homozygoty 5D/5D genu *PPP3R1*

Rozkłady genotypów polimorfizmu insercyjno/delecyjnego *PPP3R1* w całej badanej grupie 162 noworodków, jak również w podgrupie noworodków płci żeńskiej i w podgrupie noworodków płci męskiej były zgodne z rozkładami teoretycznymi wynikającymi z równowagi Hardy’ego-Weinberga (odpowiednio: $p=0.834$, $p=0.907$ i $p=0.501$). W całej badanej grupie zidentyfikowano 135 homozygot 5I/5I (83.3%), 26 heterozygot 5I/5D (16.1%) i 1 homozygotę 5D/5D (0.6%). Częstość allelu 5I *PPP3R1* wynosiła 91.4%, a allelu 5D 8.6%. Wśród 71 noworodków płci żeńskiej zidentyfikowano 56 homozygot 5I/5I (78.9%), 14 heterozygot 5I/5D (19.7%) i 1 homozygotę 5D/5D (1.4%). Częstość allelu 5I w tej podgrupie wynosiła 88.7%, a allelu 5D 11.3%. Z kolei, wśród 91 noworodków płci męskiej stwierdzono 79 homozygot 5I/5I (86.8%) i 12 heterozygot 5I/5D (13.2%), a częstości alleli *PPP3R1* wynosiły 93.4% dla 5I i 6.6% dla 5D. Pomiędzy noworodkami płci żeńskiej i noworodkami płci męskiej nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie częstości genotypów ($p=0.178$) i alleli ($p=0.137$) polimorfizmu 5I/5D genu *PPP3R1*.

Przeprowadzona przy zastosowaniu testu Kołmogorowa-Smirnowa i testu Lillieforsa analiza zmiennych ilościowych wykazała dla większości z nich przynajmniej w jednym z tych testów brak zgodności ich rozkładu z rozkładem normalnym (Tabela 1), w związku z czym w ich dalszej analizie zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitney’a.

Tabela 1. Analiza normalności rozkładu badanych zmiennych ilościowych.

Zmienna	p_{K-S}	p_L
BW [kg]	>0.05	>0.05
BL [m]	>0.05	<0.01
BSA [m ²]	>0.05	>0.05
IVST [mm]	<0.01	<0.01
LVPWT [mm]	>0.05	<0.01
LVID [mm]	>0.05	<0.05
LVM [g]	>0.05	<0.01
LVM/BW [g/kg]	<0.01	<0.01
LVM/BL [g/m]	>0.05	<0.01
LVM/BSA [g/m ²]	<0.05	<0.01

p_{K-S} – istotność statystyczna w teście Kołmogorowa-Smirnowa

p_L – istotność statystyczna w teście Lillieforsa

Wyniki porównania tych zmiennych pomiędzy grupą noworodków płci żeńskiej i grupą noworodków płci męskiej (Tabela 2) wskazują, że jedynie masa ciała (BW) i pole powierzchni ciała (BSA) różniły się istotnie pomiędzy dziewczynkami i chłopcami. Zarówno BW, jak i BSA u noworodków płci żeńskiej były istotnie mniejsze w porównaniu do wartości tych zmiennych u noworodków płci męskiej.

Tabela 2. Charakterystyka badanych noworodków w zależności od płci.

Zmienna	Noworodki płci żeńskiej (n=71)	Noworodki płci męskiej (n=91)	p _{M-W}
BW [kg]	3.32 2.64-4.30	3.56 2.65-5.09	0.014
BL [m]	0.55 0.51-0.63	0.56 0.47-0.63	0.311
BSA [m ²]	0.230 0.195-0.270	0.234 0.199-0.289	0.037
IVST [mm]	3.9 2.4-6.3	3.7 2.4-5.1	0.139
LVPWT [mm]	2.7 1.1-5.8	2.8 2.0-4.0	0.307
LVID [mm]	18.3 16.0-25.0	18.1 15-23.2	0.402
LVM [g]	9.4 4.9-21.9	9.7 5.4-17.6	0.552
LVM/BW [g/kg]	2.8 1.5-6.4	2.9 1.8-5.6	0.962
LVM/BL [g/m]	16.8 9.0-35.9	17.8 10-32.1	0.790
LVM/BSA [g/m ²]	53.3 29.0-116.0	55.9 34.5-106.3	0.869

Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w zakresie wszystkich analizowanych zmiennych ilościowych pomiędzy noworodkami z genotypem typu dzikiego (135 homozygot 5I/5I *PPP3R1*) a noworodkami z przynajmniej jednym allelem delecyjnym *PPP3R1* (tj. 26 heterozygot 5I/5D + 1 homozygota 5D/5D) (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka badanych noworodków w zależności od polimorfizmu *PPP3R1*.

Zmienna	II (n=135)	ID+DD (n=26+1)	p _{M-W}
BW [kg]	3.37 2.64-4.48	3.47 2.84-5.09	0.432
BL [m]	0.56 0.47-0.63	0.56 0.50-0.60	0.572
BSA [m ²]	0.230 0.195-0.276	0.232 0.203-0.289	0.643
IVST [mm]	3.8 2.4-6.1	3.8 2.8-6.3	0.955
LVPWT [mm]	2.8 1.1-5.8	3.0 1.6-5.0	0.317
LVID [mm]	18.4 15.0-25.0	18.1 15.0-22.0	0.579
LVM [g]	9.7 4.9-21.9	9.4 6.0-19.5	0.946
LVM/BW [g/kg]	2.8 1.5-6.4	3.0 1.9-5.2	0.590
LVM/BL [g/m]	17.4 9.0-35.9	18.3 11.0-33.3	0.794
LVM/BSA [g/m ²]	42.0 22.3-90.6	44.7 27.9-78.8	0.650

Ostatnim etapem analizy statystycznej było porównanie częstości rozkładu genotypów polimorfizmu 5I/5D *PPP3R1* pomiędzy dolnymi i górnymi tertylami wartości trzech wskaźników LVM tj. LVM/BW, LVM/BL i LVM/BSA. Częstości genotypów *PPP3R1* z co najmniej jednym allelem 5D (5I/5D i 5D/5D) w górnych tertylach wartości LVM/BW i LVM/BSA były istotnie większe w porównaniu do ich rozpowszechnienia w dolnych tertylach tych zmiennych. Jedynie dla dolnego i górnego tertyla LVM/BL nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie ($p=0.056$) w rozpowszechnieniu genotypów polimorfizmu 5I/5D promotora *PPP3R1* (Tabela 4).

Tabela 4. Dolny i górny tertyl wskaźników masy serca noworodków w zależności od polimorfizmu *PPP3R1*.

Zmienna	Tertyle	II	ID+DD	p_{χ^2}
		n (%)	n (%)	
LVM/BW [g/kg]	DT: ≤ 2.6	49	5	0.007
	GT: ≥ 3.1	38	16	
LVM/BL [g/m]	DT: ≤ 15.5	47	7	0.056
	GT: ≥ 19.4	39	15	
LVM/BSA [g/m ²]	DT: ≤ 38.4	48	6	0.029
	GT: ≥ 45.8	39	15	

5. Dyskusja

Zwiększenie masy lewej komory serca (LVM) oraz arbitralnie zdefiniowany przerost lewej komory (LVH) są istotnymi czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego (29). Masa lewej komory jest cechą ciągłą, którą moduluje złożona interakcja pomiędzy czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. W oparciu o wyniki badań bliźniąt, jak również o wyniki badań populacyjnych szacuje się, że czynniki genetyczne warunkują od 30% do 70% zmienności masy serca (30-34).

Według Han i wsp. (35) zdrowe donoszone noworodki, ze względu na brak oddziaływania czynników środowiskowych takich, jak dieta, styl życia, palenie tytoniu, współistniejące choroby lub przyjmowanie leków, utrudniających właściwą ocenę roli czynników genetycznych w determinowaniu fenotypów klinicznych układu sercowo-naczyniowego są optymalną grupą populacyjną do identyfikacji tych czynników. Jednak mimo tego, w piśmiennictwie naukowym dostępne są tylko pojedyncze doniesienia poświęcone temu zagadnieniu w odniesieniu do cechy fenotypowej, jaką jest masa lewej komory serca (24–27).

Według mojej wiedzy niniejsza rozprawa jest pierwszym w świecie doniesieniem zogniskowanym na analizie związku polimorfizmu rs3039851 w promotorze genu *PPP3R1* kodującego podjednostkę B kalcyneuryny (CnB) z masą lewej komory serca u zdrowych noworodków urodzonych o czasie.

W wersji genomu GRCh38.p14 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC000002.12>) gen *PPP3R1* zlokalizowany jest na chromosomie 2p14 w pozycji od 2:68178857 do 2:68256237. W roku 2005 Tang i wsp. przeprowadzili sekwencjonowanie genu *PPP3R1* w próbkach genomowego DNA pobranych od 25 niespokrewnionych osób o różnym pochodzeniu etnicznym i w jego promotorze odkryli polimorfizm insercyjno-delecyjny (5I/5D, rs3039851) stanowiący obecnie przedmiot analiz w mojej pracy. Autorzy ci w identyfikacji genotypów 5I/5D *PPP3R1* w badaniu grupy 368 osób

z ciężkim nadciśnieniem tętniczym zastosowali metodę PCR-RFLP z enzymem restrykcyjnym *AseI*. Miejsce restrykcyjne dla tego enzymu (AT..TAAT/TAAT..TA) jest obecne tylko w allelu 5I, a w przypadku inkubacji z *AseI* ampliconu allelu 5D pozostaje on niestrawiony. Metoda PCR-RFLP z *AseI* została zastosowana w analizie rs3039851 we wszystkich znanych mi publikacjach (19-21,36). W swojej rozprawie również zastosowałam tę metodę identyfikacji genotypów polimorfizmu rs3039851 *PPP3R1*, z tym, że do amplifikacji DNA w PCR zaprojektowano inne startery niż w pracy Tang i wsp. (19). Dodam też, że w odróżnieniu od tych autorów, którzy w analizach jako tzw. kontrole pozytywne zastosowali próbki DNA o znanym genotypie (uprzednio zidentyfikowanym przez sekwencjonowanie), w swoich badaniach wiarygodność genotypowania metodą PCR-RFLP weryfikowałam poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych próbek DNA.

Na podstawie dostępnego mi piśmiennictwa sądzę, że moja rozprawa doktorska jest nie tylko pierwszą w świecie pracą poświęconą analizie powiązania polimorfizmu 5I/5D *PPP3R1* z masą lewej komory serca u zdrowych noworodków, ale także pierwszym doniesieniem opisującym częstość tego polimorfizmu u Polaków. Zbadaną przeze mnie grupę stanowiły 162 noworodki urodzone w Szczecinie tj. będące potomkami osób, które po II wojnie światowej przeniosły się na Pomorze Zachodnie z wielu zakątków dawnej II Rzeczypospolitej (37,38). Migracja ta uważana jest za główną przyczynę tego, iż współcześni mieszkańcy naszego regionu są uznawani za próbę reprezentatywną dla całej polskiej populacji (39,40). Stąd też określona przeze mnie częstość allelu 5D genu *PPP3R1* u szczecińskich noworodków, która wynosi 8.6% może być traktowana jako wartość odpowiadająca rzeczywistemu rozpowszechnieniu tego wariantu genetycznego wśród Polaków. Warto zauważyć, że bardzo zbliżoną częstość wariantu 5D (8.8%) stwierdzili Akhmetov i wsp. w innej grupie Słowian tj. w grupie złożonej z 1073 młodych (średnia wieku ok. 18 lat)

zdrowych Rosjan (20). Z kolei, w artykule Tang i wsp., odkrywców polimorfizmu rs3039851, częstość allelu delecyjnego *PPP3R1* u osób białych (n=171) wynosiła 7.6%, a wśród Afroamerykanów (n=197) aż 23.9% (19). Na różnice w rozpowszechnieniu allelu 5D w różnych grupach etnicznych zwrócili uwagę również Hand i wsp., którzy w grupie osób białych w USA (n=95) określili częstość tego wariantu na 7.0%, a w grupie Afroamerykanów (n=33) aż na 24.0% (36). W 2017 roku Maddhuri i wsp. w grupie 300 zdrowych dorosłych Hindusów stwierdzili, że częstość allelu 5D *PPP3R1* wynosiła 28.3% (21). Warto również porównać te dane z wynikami przeprowadzonej w ramach projektu 1000 Genomów (ensembl.org) identyfikacji polimorfizmu 5I/5D *PPP3R1* u ponad 2500 osób (Tabela 5). Rozpowszechnienie polimorfizmu rs3039851 w cytowanych powyżej doniesieniach dotyczących osób pochodzenia europejskiego (19,20,36), w tym i noworodków badanych w mojej rozprawie, osób pochodzenia afrykańskiego (19,36) oraz Hindusów (21) wykazuje dużą zbieżność z częstością tego polimorfizmu w odpowiadających im grupach etnicznych analizowanych w projekcie 1000 Genomów. Dla przykładu, rozpowszechnienie allelu 5D *PPP3R1* u badanych przeze mnie polskich noworodków było identyczne z częstością tego wariantu w populacji CEU tj. u współczesnych mieszkańców stanu Utah, których przodkowie przybyli na kontynent amerykański z krajów północnej i zachodniej Europy oraz bardzo zbliżone do wartości (8.2%) stwierdzonych u mieszkańców wielkiej Brytanii. Z kolei, stwierdzenie braku zmienności polimorfizmu rs3039851 u Chińczyków Han z Pekinu oraz bardzo małej częstości tego polimorfizmu (od 0.5% do 1.5%) w pozostałych 4 populacjach z Azji Wschodniej objętych badaniami w tym projekcie uzupełnia naszą wiedzę na temat różnic w rozpowszechnieniu polimorfizmu 5I/5D promotora *PPP3R1* zależnych od pochodzenia etnicznego i lokalizacji geograficznej poszczególnych populacji.

Tabela 5. Częstość allelu 5D *PPP3R1* w populacjach z projektu 1000 Genomów

Populacja (liczba osób)	Allel 5D
Populacje europejskie (503):	7.3
CEU * (99)	8.6
FIN, Finowie (99)	5.6
GBR, mieszkańcy Wielkiej Brytanii (91)	8.2
IBS, Hiszpanie (107)	9.3
TSI, Włosi (107)	4.7
Populacje amerykańskie (347):	10.1
CLM, Kolumbijczycy (94)	8.5
MXL, Meksykanie (64)	9.4
PEL, Peruwiańczycy (85)	5.3
PUR, Portorykanie (104)	15.9
Populacje wschodnioazjatyckie (504):	0.6
CDX, mniejszość Dai w Chinach (93)	0.5
CHB, Han z Pekinu (103)	0.0
CHS, Han z południowych Chin (105)	0.5
JPT, Japończycy (104)	0.5
KHV, Wietnamczycy (99)	1.5
Populacje południowoazjatyckie (489):	9.8
BEB, Bengalczyki (86)	9.3
GIH, Gudżaratowie (103)	14.1
ITU, Telugowie (102)	4.9
PJL, Pendżabczyki (96)	11.5
STU, Tamilowie (102)	9.3
Populacje afrykańskie (661)	25.7
ACB, Afrokaraibowie z Barbadosu (96)	22.9
ASW, Afroamerykanie z USA (61)	31.1
ESN, Esan z Nigerii (99)	28.3
GWD, Gambijczycy (113)	25.2
LWK, Luhja z Kenii (99)	28.3
MSL, Mende z Sierra Leone (85)	22.9
YRI, Jorubowie z Nigerii (108)	23.1

* CEU – współcześni mieszkańcy stanu Utah, których przodkowie przybyli do USA z północnej i zachodniej części Europy.

Bez wątpienia najważniejszym i oryginalnym spostrzeżeniem w mojej pracy jest potwierdzenie u donoszonych, zdrowych noworodków związku pomiędzy polimorfizmem insercyjno-delecyjnym genu *PPP3R1* i masą lewej komory serca wyznaczoną metodą nieinwazyjną (ultrasonografia serca) tuż po urodzeniu.

W 1998 roku Molkentin i wsp. (14) w badaniach myszy transgenicznym odkryli, że zwiększona aktywność kalcyneuryny jest wystarczającym czynnikiem indukcji przerostu mięśnia sercowego. Od tego czasu opublikowano wiele badań, których wyniki dostarczyły kolejne dowody potwierdzające, że to kalcyneuryna jest kluczowym mediatorem w patogenezie przerostu mięśnia sercowego. W badaniach doświadczalnych wykazano m.in., że u szczurów i u myszy czynniki takie jak: przeciążenie ciśnieniowe, katecholaminy lub trening fizyczny zwiększały aktywność kalcyneuryny w miokardium i indukowały przerost mięśnia sercowego, a obu tym zmianom można było zapobiec lub złagodzić ich przebieg za pomocą farmakoterapii lub drogą hamowania transgenicznego (41–44). Z kolei, u ludzi odnotowano podwyższoną aktywność kalcyneuryny w kardiomiocytach w różnych typach przerostu mięśnia sercowego, w tym również i tym będącym powikłaniem nadciśnienia tętniczego (45,46). U ludzi i u myszy wykazano także, że aktywność kalcyneuryny i jej ekspresja są większe w hipertroficznym miokardium w porównaniu do zdrowego mięśnia sercowego bez cech przerostu (44–47). Warto dodać, że Cao i wsp. stwierdzili silną dodatnią korelację między aktywnością kalcyneuryny w surowicy i wskaźnikiem masy lewej komory u Chińczyków z nadciśnieniem tętniczym (22). Ponadto, wyniki badania przeprowadzonego u Hindusów z chorobą wieńcową sugerują związek allelu 5D polimorfizmu *PPP3R1* analizowanego w mojej rozprawie z wyższym stężeniem kalcyneuryny w surowicy (21). Według Tang i wsp. u Afroamerykanów silniejsze powiązanie polimorfizmu rs3039851 z tzw. „niewłaściwie dużą masą lewej komory (ang. inappropriately high LV mass) niż z przerostem mięśnia sercowego (definicje obu

tych terminów podano w podrozdziale 1.3) wydaje się sugerować, że ten polimorfizm (modulujący aktywność kalcyneuryny lub przynajmniej pośrednio powiązany z aktywnością tego enzymu) nie odgrywa istotnej roli w fizjologicznych mechanizmach determinujących prawidłową masę serca (19). W mojej opinii dostępne piśmiennictwo, w tym i artykuły poświęcone ocenie związku polimorfizmu rs3039851 *PPP3R1* z masą lewej komory serca u ludzi, a także wyniki mojej rozprawy nie potwierdzają tej hipotezy. Po pierwsze, już w 2002 roku Bueno i wsp. u transgenicznym myszy pozbawionych genu kodującego izoformę beta podjednostki katalitycznej kalcyneuryny (CnAb) odkryli nie tylko znaczne ograniczenie zdolności do przerostu miokardium w odpowiedzi na przeciążenie ciśnieniowe serca, wlew angiotensyny drugiej lub izoproterenolu, ale także wskazali, iż w 8 tygodniu po urodzeniu masa serca u tych młodych zwierząt jest istotnie (o 12%) mniejsza w porównaniu do będących w tym samym wieku myszy bez uszkodzenia genu dla CnAb (48). Po drugie, zarówno Tang i wsp. (19), jak i później Akhmetov i wsp. (20) swoje badania przeprowadzili w grupach osób dorosłych narażonych na wieloletnie działanie, odpowiednio, nadciśnienia tętniczego lub treningu sportowego, tj. czynników środowiskowych o udokumentowanej zdolności zarówno do aktywacji kalcyneuryny, jak i indukcji przerostu mięśnia sercowego. Autorzy ci nie przeprowadzili również oceny korelacji genotypowo-fenotypowej dla wskaźnika masy lewej komory serca traktowanego jako cecha fenotypowa ciągła, a przeprowadzili analizę związku polimorfizmu 5I/5D *PPP3R1* z przerostem mięśnia sercowego lewej komory lub z tzw. „niewłaściwie dużą masą lewej komory” tj. ze zmiennymi dyskretnymi o ściśle zdefiniowanych punktach odcięcia. Moje badania zaś zostały przeprowadzone w grupie zdrowych donoszonych noworodków, u których wskaźniki masy lewej komory serca mieściły się w zakresie wartości fizjologicznych dla tego wieku i które nie były narażone na działanie niekorzystnych czynników środowiskowych wymienionych powyżej. W ocenie

związku genotypu *PPP3R1* z trzema fenotypami klinicznymi tj. z masą lewej komory standaryzowaną względem masy ciała, długości ciała lub powierzchni ciała (odpowiednio: LVM/BW, LVM/BL i LVM/BSA) stwierdziłam brak istotnego związku pomiędzy polimorfizmem rs3039851 a każdym z wyżej wymienionych wskaźników masy serca. Warto jednak zauważyć, że w porównaniu do noworodków homozygotycznych dla allelu typu dzikiego (homozygoty 5I/5I) u noworodków z co najmniej jednym allelem 5D (5I/5D lub 5D/5D) każdy z tych wskaźników był o kilka procent większy (dla LVM/BW o 7.1%, dla LVM/BL o 5.2%, a dla LVM/BSA o 6.2%). Z kolei, wykonane przeze mnie porównanie rozpowszechnienia polimorfizmu 5I/5D *PPP3R1* w grupach noworodków o najmniejszych (dolny tertyl) i o największych (górny tertyl) wartościach wskaźników masy lewej komory wykazało istotnie większą, w porównaniu do dolnego tertyla, częstość genotypów z co najmniej jednym allelem delecyjnym (5I/5D + 5D/5D) wśród noworodków z górnego tertyla LVM/BW i LVM/BSA (tylko dla LVM/BL wartość p była większa niż 0.05).

Mimo wielu lat, które upłynęły od czasu odkrycia przez Tang i wsp. polimorfizmu 5I/5D promotora genu *PPP3R1* jego znaczenie funkcjonalne nadal pozostaje nieznane (19). Jednak już ci autorzy wskazali, że delecja 5 nukleotydów (allel 5D) w promotorze *PPP3R1* powoduje zniesienie miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego NKX-2, który odgrywa bardzo istotną rolę w regulacji miogenezy i w rozwoju miokardium (49,50). U myszy gen *Nkx2-5*, który należy do genów tej rodziny czynników transkrypcyjnych, w okresie embriogenezy ulega ekspresji w mezodermie przedsercowej i w mięśniu sercowym, a jego uszkodzenie na tym etapie rozwoju prowadzi do nieprawidłowej morfogenezy serca, opóźnienia wzrostu i śmierci zarodków 9-10 dni po zapłodnieniu. Z kolei, Schott i wsp. oraz Benson i wsp. odkryli, że mutacje genu *NKX2-5* są przyczyną wrodzonych wad serca u ludzi (51,52). U chorych z wadami serca spowodowanymi mutacjami tego genu najczęściej

występowały: blok przedsionkowo-komorowy i ubytek przegrody międzyprzedsionkowej, ale u niektórych z tych osób stwierdzano również inne nieprawidłowości anatomiczne, takie jak: ubytek przegrody międzykomorowej, tetralogia Fallota lub anomalia Ebsteina (51,52). Stąd też Tang i wsp. wysunęli hipotezę, że motyw dla NKX-2 jest ważnym miejscem wiązania represora lub inhibitora transkrypcji CnB, a delecja 5 nukleotydów w tym regionie prowadzi do zwiększenia ekspresji tego genu i w konsekwencji zwiększenia aktywności kalcyneuryny (19). Mimo sugerowanego powyżej związanego z motywem wiązania NKX-2 znaczenia czynnościowego polimorfizmu 5I/5D ci sami autorzy stwierdzili jednak, iż nie można wykluczyć, że wspomniany polimorfizm genu *PPP3R1* pozostaje jedynie w ścisłej nierównowadze sprzężenia (linkage disequilibrium) z jakimś, dotąd jeszcze niezidentyfikowanym, wariantem genetycznym o rzeczywistym znaczeniu funkcjonalnym (19). Hipoteza ta wydaje się być w pełni racjonalna, zwłaszcza w świetle opublikowanej w roku 2022 pracy Alsheikh i wsp., którzy wskazali na pilną potrzebę oceny rzeczywistego znaczenia funkcjonalnego zidentyfikowanych w GWAS polimorfizmów genetycznych związanych z predyspozycją do określonych chorób, gdyż aż 90% z nich to warianty niekodujące (53). Stąd też pod kątem ewentualnego sprzężenia z rs3039851 przeanalizowałam dane z bazy GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) dotyczące znajdujących się w niej polimorfizmów genu *PPP3R1*, szczególnie pod kątem ich ewentualnego powiązania z takimi fenotypami klinicznymi, jak przerost lub masa lewej komory serca, ciśnienie tętnicze lub nadciśnienie tętnicze oraz trening lub wysiłek fizyczny. W GWAS Catalog odnalazłam 12 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu *PPP3R1*, ale żaden z nich nie był związany z wyżej wymienionymi fenotypami. Intrygujące jest natomiast to, że w *locus* na chromosomie 2. obejmującym 100 tysięcy par zasad w kierunku 5' i 100 tysięcy par zasad w kierunku 3' od regionu polimorfizmu rs3039851 *PPP3R1* (insercja położona

jest w regionie 2:68218182 – 2:68218190) odnalazłam 3 polimorfizmy związane z fenotypami ciśnienia tętniczego, a mianowicie: rs6757906 (2:68127595) i rs6731373 (2:68275912) powiązane ze skurczowym ciśnieniem tętniczym oraz rs2044693 (2:68157965) związany zarówno ze skurczowym ciśnieniem tętniczym, jak i bezpośrednio z nadciśnieniem tętniczym. Na koniec warto też dodać, że w 2013 roku Gorący i wsp. w grupie noworodków, z których większość analizowałam również w mojej pracy, odkryli istotny związek polimorfizmu rs7565161 (2:47267888) położonego w pobliżu *locus* genu *CALM2* kodującego kalmodulinę 2 (białko aktywujące kalcyneurynę) z masą lewej komory serca określoną w pierwszych dniach po urodzeniu się tych dzieci (25).

6. Wnioski

1. Zastosowana w niniejszej rozprawie metoda PCR-RFLP pozwala na wiarygodną identyfikację polimorfizmu 5I/5D (rs3039851) promotora genu *PPP3R1* kodującego podjednostkę B kalcyneuryny.
2. Częstość allelu 5D polimorfizmu rs3039851 genu *PPP3R1* u Polaków, określona w reprezentatywnej grupie zdrowych noworodków urodzonych o czasie, jest zbliżona do rozpowszechnienia tego wariantu genetycznego w innych populacjach pochodzenia europejskiego.
3. Polimorfizm 5I/5D (rs3039851) promotora genu *PPP3R1* jest związany z masą lewej komory serca u zdrowych donoszonych noworodków.

7. Streszczenie w języku polskim

Upřednio stwierdzono, że polimorfizm insercyjno/delecyjny 5 par zasad (5I/5D, rs3039851) w promotorze genu *PPP3R1* kodującego podjednostkę B1 kalcyneuryny jest związany z przerostem lewej komory (LVH) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym lub u sportowców. Brak jest jednak danych dotyczących związku *PPP3R1*: rs3039851 ze zmiennością masy lewej komory (LVM) wśród zdrowych osób nienarażonych na czynniki ryzyka indukujące LVH.

Dlatego celami moich badań były:

1. Opracowanie metody PCR-RFLP identyfikacji polimorfizmu insercyjno/delecyjnego *PPP3R1*.
2. Ocena częstości polimorfizmu insercyjno/delecyjnego *PPP3R1* w grupie zdrowych noworodków urodzonych o czasie.
3. Analiza związku pomiędzy polimorfizmem insercyjno/delecyjnym *PPP3R1* i masą lewej komory u zdrowych noworodków urodzonych o czasie.

Grupę badaną stanowiło 162 zdrowych noworodków urodzonych o czasie. Do oceny LVM zastosowano dwuwymiarową echokardiografię w trybie M. Polimorfizm 5I/5D *PPP3R1* w próbkach genomowego DNA wyekstrahowanego z leukocytów krwi pępowinowej noworodków identyfikowano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) i potwierdzano przez sekwencjonowanie.

Nie stwierdzono istotnych różnic między noworodkami homozygotycznymi pod względem allelu typu dzikiego (5I/5I, n=135) i noworodkami z co najmniej jednym allelem 5D (5I/5D+ 5D/5D, n=27) dla LVM znormalizowanej względem masy ciała, długości ciała lub pola powierzchni ciała (odpowiednio: LVM/BM, LVM/BL lub LVM/BSA). Jednak częstość występowania genotypów *PPP3R1* z allelem 5D wśród noworodków z największymi LVM/BM lub LVM/BSA (górne tertyle) była istotnie

wyższa w porównaniu z ich rozpowszechnieniem u noworodków z najniższymi wartościami obu wskaźników (dolne tertyle).

Wnioski:

1. Zastosowana w niniejszej rozprawie metoda PCR-RFLP pozwala na wiarygodną identyfikację polimorfizmu 5I/5D (rs3039851) promotora genu *PPP3R1* kodującego podjednostkę B1 kalcyneuryny.
2. Częstość allelu 5D polimorfizmu rs3039851 genu *PPP3R1* u Polaków, określona w reprezentatywnej grupie zdrowych noworodków urodzonych o czasie, jest zbliżona do rozpowszechnienia tego wariantu genetycznego w innych populacjach pochodzenia europejskiego.
3. Polimorfizm 5I/5D (rs3039851) promotora genu *PPP3R1* jest związany z masą lewej komory serca u zdrowych donoszonych noworodków.

8. Streszczenie w języku angielskim

Previously, the 5-base pair insertion/deletion (5I/5D, rs3039851) polymorphism in the promoter of *PPP3R1* gene encoding calcineurin subunit B1 has been found to be associated with left ventricular hypertrophy (LVH) in hypertensive patients or in athletes. However, no data are available concerning the association of *PPP3R1*: rs3039851 with the variation of left ventricular mass (LVM) amongst healthy subjects not exposed to the risk factors inducing LVH.

Therefore, the aims of my study were:

1. To develop the PCR-RFLP method to identify the insertion/deletion *PPP3R1*.
2. To assess the prevalence of the insertion/deletion *PPP3R1* polymorphism in a group of healthy full-term newborns.
3. To analyze the association between the insertion/deletion *PPP3R1* polymorphism and left ventricular mass in healthy full-term newborns.

The study group consisted of 162 full-term healthy newborns. Two-dimensional M-mode echocardiography was used to assess LVM. The 5I/5D *PPP3R1* polymorphism was identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and validated by sequencing in samples of genomic DNA extracted from cord blood leukocytes of the newborns.

No significant differences between newborns homozygous for wild-type allele (5I/5I, n=135) and newborns carrying at least one 5D allele (5I/5D+ 5D/5D, n=27) have been found for LVM normalized for body mass, body length or body surface area (LVM/BM, LVM/BL or LVM/BSA, respectively). However, the frequency of *PPP3R1* genotypes with 5D allele among newborns with biggest LVM/BM or LVM/BSA (upper tertiles) was significantly higher as compared with their prevalence in individuals with the lowest values of both indices (lower tertiles).

Conclusions:

1. The PCR-RFLP method used in this dissertation allows for reliable identification of the 5I/5D polymorphism (rs3039851) in the promoter of the *PPP3R1* gene encoding the B1 subunit of calcineurin.
2. The frequency of the 5D allele of the rs3039851 *PPP3R1* polymorphism in Poles, determined in a representative group of healthy full-term newborns, is similar to the prevalence of this genetic variant in other populations of European descent.
3. The 5I/5D polymorphism (rs3039851) in the promoter of the *PPP3R1* gene is associated with left ventricular mass in healthy full-term newborns.

9. Piśmiennictwo

1. Waardenberg AJ, Ramialison M, Bouveret R, Harvey RP. Genetic networks governing heart development. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Oct 3;4(11):a013839. doi: 10.1101/cshperspect.a013839.
2. Respondek-Liberska M. Rozwój płodowy serca i dużych naczyń. W: Wady serca, Hryniewiecki T, Gąsior Z, Rużyło W (red), Tom 1. Wydawnictwo Medical Tribune, Warszawa 2022, 10-22.
3. Mommersteeg MTM, Hoogaars WMH, Prall OWJ, de Gier-De Vries C, Wiese C, Clout DEW, i in. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res.* 2007; 100(3):354–62.
4. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243.
5. Hardingham GE, Bading H. Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. *Biometals.* 1998 Dec;11(4):345-58. doi: 10.1023/a:1009257909785.
6. Chen L, Song M, Yao C. Calcineurin in development and disease. *Genes Dis.* 2021 Mar 15;9(4):915-927. doi: 10.1016/j.gendis.2021.03.002.
7. Creamer TP. Calcineurin. *Cell Commun Signal.* 2020 Aug 28;18(1):137. doi: 10.1186/s12964-020-00636-4.
8. Li H, Rao A, Hogan PG. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol.* 2011 Feb;21(2):91-103. doi: 10.1016/j.tcb.2010.09.011.
9. Brauer BL, Moon TM, Sheftic SR, Nasa I, Page R, Peti W, Kettenbach AN. Leveraging New Definitions of the LxVP SLiM To Discover Novel Calcineurin Regulators and Substrates. *ACS Chem Biol.* 2019 Dec 20;14(12):2672-2682. doi: 10.1021/acscchembio.9b00606.

10. Chen J, Balakrishnan-Renuka A, Hagemann N, Theiss C, Chankiewicz V, Chen J, Pu Q, Erdmann KS, Brand-Saberi B. A novel interaction between ATOH8 and PPP3CB. *Histochem Cell Biol*. 2016 Jan;145(1):5-16. doi: 10.1007/s00418-015-1368-5.
11. Chen Y, Holstein DM, Aime S, Bollo M, Lechleiter JD. Calcineurin β protects brain after injury by activating the unfolded protein response. *Neurobiol Dis*. 2016 Oct;94:139-56. doi: 10.1016/j.nbd.2016.06.011.
12. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 1992 Jun 25;357(6380):695-7. doi: 10.1038/357695a0.
13. Gao C, Wang Y. Positive Role for a Negative Calcineurin Regulator in Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 2016 May;67(5):841-2. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07140.
14. Molken JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):215-28. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81573-1.
15. Felkin LE, Narita T, Germack R, Shintani Y, Takahashi K, Sarathchandra P, López-Olañeta MM, Gómez-Salineró JM, Suzuki K, Barton PJ, Rosenthal N, Lara-Pezzi E. Calcineurin splicing variant calcineurin A β 1 improves cardiac function after myocardial infarction without inducing hypertrophy. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2838-47. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012211.
16. Martínez-Martínez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem*. 2004 Apr;11(8):997-1007. doi: 10.2174/0929867043455576.
17. Chen CH, Lin JW, Huang CY, Yeh YL, Shen CY, Badrealam KF, Ho TJ, Padma VV, Kuo WW, Huang CY. The combined inhibition of the CaMKII δ and calcineurin signaling cascade attenuates IGF-IIR-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2020 Apr;235(4):3539-3547. doi: 10.1002/jcp.29242.

18. Parra V, Rothermel BA. Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Feb;103:121-136. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.12.006
19. Tang W, Arnett DK, Devereux RB, Panagiotou D, Province MA, Miller MB, de Simone G, Gu C, Ferrell RE. Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B (PPP3R1) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 2005 Oct;150(4):845-51. doi: 10.1016/j.ahj.2004.12.004.
20. Ahmetov II, Linde EV, Popov DV, Shihova JV, Missina SS, Vinogradova OL, Rogozkin VA. The influence of calcineurin gene polymorphism on morphofunctional characteristics of cardiovascular system of athletes. *Rus J Physiol* 2008, 94: 915-922.
21. Maddhuri S, Bandaru S, Bhukya C, Cingeetham V, Malempati AR, Deepika MLN, Nallari P, Mundluru HP. Association of CnB 5I/5D promoter gene polymorphism and serum calcineurin levels in early onset of coronary artery disease of south Indian cohort. *Gene.* 2017 Oct 20;632:1-6. doi: 10.1016/j.gene.2017.08.002.
22. Cao JL, Yang YQ, Nabeel DM, Sun YL, Zou HY, Kong XQ, Lu XZ. Correlation between Serum Calcineurin Activity and Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients and Its Clinical Significance. *Cardiology.* 2018;139(2):124-131. doi: 10.1159/000481280.
23. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med.* 1987 Oct 22;317(17):1098. doi: 10.1056/NEJM198710223171717.
24. Gorący I, Safranow K, Dawid G, Skonieczna-Żydecka K, Kaczmarczyk M, Gorący J, Loniewska B, Ciechanowicz A. Common genetic variants of the BMP4, BMPR1A, BMPR1B, and ACVR1 genes, left ventricular mass, and other parameters of the heart in newborns. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012 Nov;16(11):1309-16. doi: 10.1089/gtmb.2012.0164.

25. Gorący I, Gorący J, Skonieczna-Żydecka K, Kaczmarczyk M, Dawid G, Ciechanowicz A. Association of genetic variation in calmodulin and left ventricular mass in full-term newborns. *Int J Genomics*. 2013;2013:410407. doi: 10.1155/2013/410407.
26. Gorący I, Dawid G, Łoniewska B, Gorący J, Ciechanowicz A. Genetics of the renin-angiotensin system with respect to cardiac and blood pressure phenotypes in healthy newborn infants. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2013 Dec;14(4):337-47. doi: 10.1177/1470320312450531.
27. Gorący I, Dawid G, Skonieczna-Żydecka K, Kaczmarczyk M, Łoniewska B, Gorący J. Association of genetic variation in the natriuretic peptide system and left ventricular mass and blood pressure in newborns. *Kardiol Pol*. 2015;73(5):366-72. doi: 10.5603/KP.a2014.0215.
28. Huwez FU, Houston AB, Watson J, McLaughlin S, Macfarlane PW. Age and body surface area related normal upper and lower limits of M mode echocardiographic measurements and left ventricular volume and mass from infancy to early adulthood. *Br Heart J*. 1994 Sep;72(3):276-80. doi: 10.1136/hrt.72.3.276.
29. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990 May 31;322(22):1561-6. doi: 10.1056/NEJM199005313222203.
30. Verhaaren HA, Schieken RM, Mosteller M, Hewitt JK, Eaves LJ, Nance WE. Bivariate genetic analysis of left ventricular mass and weight in pubertal twins (the Medical College of Virginia twin study). *Am J Cardiol*. 1991 Sep 1;68(6):661-8. doi: 10.1016/0002-9149(91)90361-n.

31. Swan L, Birnie DH, Padmanabhan S, Inglis G, Connell JM, Hillis WS. The genetic determination of left ventricular mass in healthy adults. *Eur Heart J*. 2003 Mar;24(6):577-82. doi: 10.1016/s0195-668x(02)00524-9.
32. Sharma P, Middelberg RP, Andrew T, Johnson MR, Christley H, Brown MJ. Heritability of left ventricular mass in a large cohort of twins. *J Hypertens*. 2006 Feb;24(2):321-4. doi: 10.1097/01.hjh.0000202815.18083.03.
33. Bella JN, MacCluer JW, Roman MJ, Almasy L, North KE, Best LG, Lee ET, Fabsitz RR, Howard BV, Devereux RB. Heritability of left ventricular dimensions and mass in American Indians: The Strong Heart Study. *J Hypertens*. 2004 Feb;22(2):281-6. doi: 10.1097/00004872-200402000-00011.
34. Assimes TL, Narasimhan B, Seto TB, Yoon S, Curb JD, Olshen RA, Quertermous T. Heritability of left ventricular mass in Japanese families living in Hawaii: the SAPPHiRe Study. *J Hypertens*. 2007 May;25(5):985-92. doi: 10.1097/HJH.0b013e32809bd740.
35. Han T, Wang X, Cui Y, Ye H, Tong X, Piao M. Relationship between angiotensin-converting enzyme gene insertion or deletion polymorphism and insulin sensitivity in healthy newborns. *Pediatrics*. 2007 Jun;119(6):1089-94. doi: 10.1542/peds.2006-3297.
36. Hand BD, Kostek MC, Ferrell RE, Delmonico MJ, Douglass LW, Roth SM, Hagberg JM, Hurley BF. Influence of promoter region variants of insulin-like growth factor pathway genes on the strength-training response of muscle phenotypes in older adults. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Nov;103(5):1678-87. doi: 10.1152/japplphysiol.00420.2007.
37. Ploski R, Wozniak M, Pawlowski R, Monies DM, Branicki W, Kupiec T, Kloosterman A, Dobosz T, Bosch E, Nowak M, Lessig R, Jobling MA, Roewer L, Kayser M. Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by

- Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum Genet.* 2002 Jun;110(6):592-600. doi: 10.1007/s00439-002-0728-0.
38. Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelman J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L, Hohoff C, Illing A, Jonkisz A, Kuzniar P, Lebiada A, Lessig R, Lewicki S, Maciejewska A, Monies DM, Pawłowski R, Poetsch M, Schmid D, Schmidt U, Schneider PM, Stradmann-Bellinghausen B, Szibor R, Wegener R, Wozniak M, Zoledziewska M, Roewer L, Dobosz T, Ploski R. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum Genet.* 2005 Sep;117(5):428-43. doi: 10.1007/s00439-005-1333-9.
 39. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Rozmiarek A, Debniak B, Załuga E, Maleszka R, Kładny J, Górski B, Cybulski C, Gronwald J, Kurzawski G, Lubinski J. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):835-9.
 40. Adler G, Łoniewska B, Parczewski M, Kordek A, Ciechanowicz A. Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants. *Pharmacol Rep.* 2009 Sep-Oct;61(5):947-51. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70154-9.
 41. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2431-7. doi: 10.1161/01.cir.101.20.2431.
 42. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation.* 2000 May 9;101(18):2134-7. doi: 10.1161/01.cir.101.18.2134.

43. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3328-33. doi: 10.1073/pnas.041614798.
44. De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3322-7. doi: 10.1073/pnas.031371998.
45. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkentin JD. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*. 2001 Feb 6;103(5):670-7. doi: 10.1161/01.cir.103.5.670.
46. Ritter O, Hack S, Schuh K, Röthlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD, Neyses L. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation*. 2002 May 14;105(19):2265-9. doi: 10.1161/01.cir.0000016044.19527.96.
47. Murat A, Pellieux C, Brunner HR, Pedrazzini T. Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *J Biol Chem*. 2000 Dec 29;275(52):40867-73. doi: 10.1074/jbc.M008071200.
48. Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta⁻-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4586-91. doi: 10.1073/pnas.072647999.
49. Bär H, Kreuzer J, Cojoc A, Jahn L. Upregulation of embryonic transcription factors in right ventricular hypertrophy. *Basic Res Cardiol*. 2003 Sep;98(5):285-94. doi: 10.1007/s00395-003-0410-2.

50. Nishida W, Nakamura M, Mori S, Takahashi M, Ohkawa Y, Tadokoro S, Yoshida K, Hiwada K, Hayashi K, Sobue K. A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7308-17. doi: 10.1074/jbc.M111824200.
51. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 1998 Jul 3;281(5373):108-11. doi: 10.1126/science.281.5373.108.
52. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest*. 1999 Dec;104(11):1567-73. doi: 10.1172/JCI8154.
53. Alsheikh AJ, Wollenhaupt S, King EA, Reeb J, Ghosh S, Stolzenburg LR, Tamim S, Lazar J, Davis JW, Jacob HJ. The landscape of GWAS validation; systematic review identifying 309 validated non-coding variants across 130 human diseases. *BMC Med Genomics*. 2022 Apr 1;15(1):74. doi: 10.1186/s12920-022-01216-w. PMID: 35365203; PMCID: PMC8973751.

10. Aneks

Polimorfizm *PPP3R1*, charakterystyka kliniczna, masa lewej komory serca i wskaźniki masy lewej komory serca u noworodków płci żeńskiej, część 1.

<i>PPP3R1</i>	BW	BL	BSA	LVM	LVM/BW	LVM/BL	LVM/BSA
DD	2.88	0.52	0.204	8.9	2.7	16.1	39.5
ID	3.30	0.55	0.225	6.0	2.0	11.0	27.9
ID	3.46	0.55	0.230	14.5	3.4	23.8	53.8
ID	3.64	0.56	0.238	9.4	2.4	15.4	36.8
ID	3.68	0.54	0.235	9.2	2.4	15.5	37.0
ID	4.14	0.56	0.254	9.9	3.0	18.3	44.7
ID	3.32	0.59	0.233	14.7	3.8	25.4	59.1
ID	3.26	0.55	0.223	19.3	5.2	33.3	78.8
ID	3.60	0.53	0.230	17.0	4.7	29.3	70.6
ID	3.69	0.56	0.240	12.8	3.5	22.8	53.3
ID	3.45	0.54	0.227	8.5	2.7	16.1	39.8
ID	3.51	0.56	0.234	8.1	2.8	14.8	38.3
ID	3.77	0.56	0.242	7.2	2.3	14.0	33.8
ID	3.52	0.55	0.232	10.8	3.1	18.9	45.7
ID	3.39	0.57	0.232	19.5	4.8	33.1	75.8
II	4.30	0.61	0.270	19.1	4.4	33.4	72.8
II	3.76	0.59	0.248	13.9	4.7	25.7	66.1
II	3.72	0.58	0.245	12.2	3.4	21.1	50.6
II	3.68	0.56	0.239	11.0	4.0	20.7	54.7
II	2.94	0.55	0.212	16.2	5.8	31.2	80.8
II	3.17	0.51	0.212	14.4	4.5	25.7	64.5
II	3.21	0.56	0.223	14.5	4.0	25.4	60.4
II	2.98	0.55	0.213	15.3	4.6	26.8	66.4
II	3.02	0.6	0.224	15.3	3.6	25.1	56.9
II	3.03	0.57	0.219	8.4	2.8	15.3	39.4
II	3.22	0.55	0.222	9.7	2.7	17.0	40.6
II	3.30	0.56	0.226	6.7	2.2	11.1	29.7
II	3.94	0.54	0.243	7.2	1.9	12.2	28.9
II	3.66	0.58	0.243	8.5	2.8	14.9	38.9
II	3.35	0.58	0.232	9.3	2.7	16.0	39.8
II	3.57	0.57	0.238	4.9	1.5	9.0	22.3
II	2.86	0.52	0.203	6.0	1.9	10.6	27.0
II	3.79	0.54	0.238	7.8	2.7	15.0	38.2
II	3.26	0.55	0.223	8.8	2.3	14.3	34.5
II	3.22	0.54	0.220	11.2	3.2	21.5	49.7
II	3.75	0.58	0.246	13.9	3.8	25.3	59.0

Polimorfizm *PPP3R1*, charakterystyka kliniczna, masa lewej komory serca i wskaźniki masy lewej komory serca u noworodków płci żeńskiej, część 2.

<i>PPP3R1</i>	BW	BL	BSA	LVM	LVM/BW	LVM/BL	LVM/BSA
II	3.36	0.56	0.229	8.8	2.8	15.5	39.8
II	3.59	0.57	0.238	11.5	3.0	19.5	45.8
II	3.15	0.55	0.219	8.7	3.0	15.9	41.2
II	3.34	0.57	0.230	7.9	2.3	14.3	34.3
II	2.98	0.55	0.213	9.7	2.8	17.1	41.4
II	3.54	0.54	0.230	8.3	2.0	13.6	30.9
II	2.80	0.51	0.199	9.0	3.0	17.6	43.6
II	3.13	0.52	0.213	8.2	2.5	14.3	35.7
II	4.30	0.6	0.268	12.4	3.8	22.1	54.8
II	3.52	0.55	0.232	9.3	2.5	16.0	38.3
II	3.80	0.58	0.247	10.3	2.8	17.4	42.0
II	3.00	0.54	0.212	10.1	3.0	19.1	45.6
II	2.75	0.53	0.201	8.3	2.6	15.1	37.6
II	2.99	0.53	0.210	21.9	6.4	35.9	90.6
II	2.81	0.54	0.205	6.9	1.7	12.7	28.2
II	3.30	0.53	0.220	15.3	4.2	26.4	63.1
II	2.64	0.52	0.195	6.8	2.4	13.1	33.8
II	3.30	0.56	0.227	9.2	2.7	16.1	39.8
II	2.82	0.53	0.204	11.9	3.0	19.2	45.5
II	3.53	0.57	0.236	11.3	2.9	19.4	45.3
II	4.09	0.6	0.261	12.9	3.0	20.5	46.9
II	3.45	0.56	0.232	11.1	2.9	19.4	44.7
II	3.69	0.58	0.244	10.1	2.8	17.4	41.7
II	3.14	0.53	0.215	8.1	2.5	15.2	37.2
II	3.09	0.52	0.211	11.4	3.5	19.6	49.9
II	3.60	0.58	0.241	9.7	2.9	16.8	41.8
II	3.85	0.56	0.245	9.1	2.2	14.7	33.8
II	2.91	0.52	0.205	10.4	2.9	18.5	43.6
II	3.27	0.63	0.239	8.3	2.4	14.1	34.6
II	2.75	0.52	0.199	8.4	2.0	13.8	31.5
II	3.21	0.52	0.215	7.9	2.2	13.8	33.2
II	3.21	0.51	0.213	7.1	2.2	14.0	32.9
II	2.94	0.53	0.208	6.5	2.0	11.5	28.6
II	3.55	0.56	0.235	8.1	2.3	13.7	33.5
II	3.28	0.59	0.232	9.3	2.5	15.4	37.1

Polimorfizm *PPP3R1*, charakterystyka kliniczna, masa lewej komory serca i wskaźniki masy lewej komory serca u noworodków płci męskiej, część 1.

<i>PPP3R1</i>	BW	BL	BSA	LVM	LVM/BW	LVM/BL	LVM/BSA
ID	5.09	0.59	0.289	6.8	2.4	13.5	34.4
ID	2.84	0.52	0.203	8.5	3.7	18.1	49.0
ID	3.47	0.56	0.232	9.0	4.8	18.8	57.1
ID	4.40	0.59	0.269	7.2	2.1	12.8	30.9
ID	3.80	0.6	0.252	11.1	2.2	18.8	38.4
ID	3.80	0.56	0.243	13.4	4.0	24.4	59.6
ID	3.95	0.57	0.250	10.3	3.6	19.8	50.6
ID	2.95	0.54	0.210	6.6	1.9	11.8	28.2
ID	3.18	0.56	0.222	7.9	2.0	14.4	32.4
ID	3.22	0.54	0.220	11.0	3.0	19.2	45.4
ID	2.99	0.5	0.204	10.7	3.8	19.8	52.3
ID	3.46	0.51	0.221	6.9	1.9	12.2	29.2
II	3.26	0.54	0.221	7.5	2.8	15.1	39.0
II	3.86	0.58	0.249	10.1	3.0	19.0	45.1
II	3.60	0.58	0.241	11.4	3.7	20.7	52.8
II	3.49	0.57	0.235	11.8	3.1	21.8	49.5
II	4.32	0.57	0.262	14.6	4.0	27.1	62.3
II	2.95	0.54	0.210	7.4	2.3	13.4	33.1
II	3.62	0.58	0.241	11.0	3.9	21.2	54.5
II	2.74	0.53	0.201	11.8	2.7	20.3	44.7
II	3.64	0.57	0.240	16.4	5.6	32.1	80.6
II	3.33	0.57	0.230	11.3	3.5	20.9	51.3
II	4.25	0.61	0.268	11.0	3.6	20.8	52.0
II	3.59	0.57	0.238	10.2	3.0	18.9	44.9
II	3.80	0.59	0.250	15.1	4.0	26.1	61.5
II	3.10	0.57	0.222	10.1	3.0	18.3	44.9
II	3.84	0.59	0.251	11.4	3.4	20.3	49.7
II	2.94	0.55	0.212	10.1	3.3	18.4	46.7
II	3.30	0.57	0.229	11.3	2.7	20.2	44.5
II	3.63	0.58	0.242	7.3	3.1	16.5	42.8

Polimorfizm *PPP3R1*, charakterystyka kliniczna, masa lewej komory serca i wskaźniki masy lewej komory serca u noworodków płci męskiej, część 2.

<i>PPP3R1</i>	BW	BL	BSA	LVM	LVM/BW	LVM/BL	LVM/BSA
II	2.81	0.52	0.201	10.1	3.2	18.6	46.5
II	3.97	0.62	0.261	9.4	2.7	16.9	40.6
II	4.34	0.63	0.276	13.1	3.0	22.2	48.8
II	3.87	0.57	0.247	10.8	2.8	18.6	43.0
II	3.65	0.58	0.242	10.4	2.9	18.2	43.5
II	3.51	0.59	0.240	12.3	3.4	21.6	51.7
II	3.31	0.51	0.217	6.9	2.2	12.1	30.8
II	3.45	0.56	0.232	7.8	2.0	13.9	31.9
II	3.32	0.55	0.225	9.1	2.9	16.2	41.2
II	3.52	0.56	0.234	7.0	2.2	13.1	32.3
II	3.89	0.55	0.244	17.6	5.6	32.0	80.3
II	3.56	0.57	0.237	11.8	3.1	19.7	46.9
II	3.39	0.53	0.223	9.3	2.8	16.3	40.3
II	4.33	0.58	0.264	8.7	2.6	16.3	38.8
II	2.92	0.51	0.203	7.2	2.4	13.1	33.7
II	3.05	0.53	0.212	8.2	2.3	15.2	35.7
II	3.06	0.55	0.216	7.8	2.0	13.5	31.2
II	3.12	0.54	0.216	7.3	2.1	13.0	31.4
II	3.92	0.58	0.251	11.9	2.7	19.8	44.1
II	3.58	0.57	0.238	12.5	2.8	20.6	45.8
II	3.17	0.57	0.224	11.1	2.9	18.8	44.0
II	3.83	0.56	0.244	9.2	3.3	18.0	46.0
II	3.10	0.56	0.220	6.4	1.8	12.3	27.9
II	3.15	0.53	0.215	8.3	2.6	15.9	38.9
II	3.37	0.53	0.223	9.6	2.6	16.2	38.6
II	3.91	0.58	0.251	10.4	2.9	19.6	45.4
II	4.36	0.6	0.270	9.6	3.1	18.1	44.8
II	3.86	0.59	0.252	9.5	2.2	15.9	35.6
II	3.64	0.52	0.229	9.1	3.1	17.1	43.5
II	3.74	0.59	0.248	11.8	3.4	21.5	50.9

Polimorfizm *PPP3R1*, charakterystyka kliniczna, masa lewej komory serca i wskaźniki masy lewej komory serca u noworodków płci męskiej, część 3.

<i>PPP3R1</i>	BW	BL	BSA	LVM	LVM/BW	LVM/BL	LVM/BSA
II	3.56	0.53	0.229	12.9	3.4	22.2	52.1
II	3.13	0.53	0.215	8.3	2.2	14.8	34.1
II	2.95	0.53	0.208	11.1	3.0	19.6	45.7
II	3.75	0.57	0.244	6.9	2.3	12.8	32.5
II	3.86	0.59	0.252	7.6	2.3	12.9	32.7
II	4.26	0.55	0.255	7.7	2.8	14.6	38.4
II	3.06	0.55	0.216	9.7	3.0	17.6	43.5
II	3.03	0.47	0.199	8.7	2.6	16.2	39.3
II	4.26	0.59	0.264	10.1	3.4	19.4	48.6
II	3.92	0.56	0.247	11.9	3.0	20.9	47.6
II	4.00	0.6	0.258	10.5	2.7	17.8	41.6
II	4.09	0.62	0.265	7.2	2.4	13.6	34.2
II	3.29	0.53	0.220	8.5	2.0	15.5	33.5
II	3.21	0.51	0.213	10.2	3.4	18.8	48.3
II	3.30	0.54	0.222	5.4	1.9	10.0	26.2
II	3.88	0.6	0.254	10.8	2.8	17.6	41.9
II	3.97	0.59	0.255	9.4	3.0	16.9	42.5
II	4.37	0.53	0.254	14.0	3.3	24.1	53.5
II	3.37	0.54	0.225	13.3	4.0	25.0	60.2
II	2.73	0.53	0.200	10.6	3.1	18.5	45.5
II	3.94	0.55	0.245	9.2	2.6	17.3	39.9
II	3.05	0.52	0.210	8.8	2.9	16.0	40.7
II	3.04	0.52	0.209	8.6	2.2	16.5	36.1
II	3.32	0.53	0.221	5.6	2.4	12.1	32.1
II	4.48	0.56	0.264	7.3	2.4	15.5	36.7
II	4.29	0.6	0.267	11.6	3.5	20.7	51.2
II	3.68	0.61	0.250	13.0	3.1	22.0	49.2
II	3.62	0.52	0.229	9.8	3.4	17.1	45.9
II	3.29	0.5	0.214	8.5	3.0	16.0	41.6
II	2.65	0.54	0.199	9.6	2.7	17.9	42.0
II	2.84	0.54	0.206	8.3	2.6	15.4	37.9

Legenda:

PPP3R1 – genotyp polimorfizmu rs3039851; BW – masa ciała [kg]; BL – długość ciała [m]; BSA – pole powierzchni ciała [m²]; LVM – masa lewej komory serca [g]; LVM/BW, LVM/BL i LVM/BSA – wskaźniki masy lewej komory znormalizowane względem, odpowiednio: masy ciała [g/kg], długości ciała [g/m] i pola powierzchni ciała [g/m²].