

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**POLIMORFISMUL PON1 ȘI MTHFR ÎN AUTISM ȘI
SCHIZOFRENIE**

**CONDUCĂTOR ȘIINȚIFIC:
PROF. DR. IOAN VICTOR POP**

**DOCTORAND:
ELEONORA DRONCA**

2010

CUPRINS

PG.

PARTEA I

DATE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

INTRODUCERE.....	1
1. SCHIZOFRENIA.....	4
1.1. Definiție și tablou clinic.....	4
1.2. Epidemiologie.....	4
1.3. Endofenotipuri.....	4
1.4. Etiopatogenie.....	5
1.4.1. Factori genetici.....	5
1.4.1.1. Anomalii cromozomiale.....	5
1.4.1.2. Gene candidate.....	8
1.4.2. Factori biochimici.....	12
1.4.3. Alți factori.....	13
2. AUTISMUL.....	15
2.1. Definiție.....	15
2.2. Tablou clinic și criterii de diagnostic.....	15
2.3. Epidemiologie.....	16
2.4. Endofenotipuri.....	16
2.5. Etiopatogenie.....	17
2.5.1. Factori genetici.....	18
2.5.1.1. Anomalii cromozomiale.....	20
2.5.1.2. Gene candidate.....	21
2.5.2. Alți factori.....	25
2.5.2.1. Anomalii metabolice.....	25
2.5.2.2. Anomalii în apărarea imună și coagulare.....	28
3. PARAOXONAZA.....	29
3.1. Caracterizarea structurală și funcțională.....	29
3.2. Polimorfismele <i>PONI</i>	33
3.2.1. SNPs din regiunea promotorului.....	33

3.2.2.	SNPs din regiunea codificatoare.....	34
3.3.	Alți factori.....	34
3.4.	Statusul PON1.....	35
3.5.	PON1 în autism.....	35
3.6.	PON1 în schizofrenie.....	36
4.	HOMOCISTEINA ȘI MTHFR.....	37
4.1.	Definiție și implicare în diverse patologii.....	37
4.2.	Metabolismul homocisteinei	37
4.3.	Reglarea metabolismului homocisteinei.....	39
4.4.	Formele homocisteinei plasmatice.....	40
4.5.	Homocisteina totală. Valori normale. Hiperhomocisteinemia.....	40
4.5.1.	Factori care influențează nivelul homocisteinei totale.....	41
4.5.2.	Polimorfismele <i>MTHFR</i>	42
4.6.	Tulburările metabolismului homocisteinei în bolile neuropsihice.....	45
4.6.1.	Neurotoxicitatea homocisteinei.....	45
PARTEA A II-A		
DATE EXPERIMENTALE		
5.	OBIECTIVELE LUCRĂRII.....	50
6.	MATERIALE ȘI METODE.....	52
6.1.	Loturile de studiu.....	52
6.2.	Dozarea homocisteinei plasmatice totale.....	52
6.3.	Determinarea activităților PON1.....	56
6.4.	Determinarea polimorfismelor <i>MTHFR</i> și <i>PON1</i>	59
6.5.	Analiza statistică a datelor.....	83
7.	REZULTATE ȘI DISCUȚII	84
7.1.	Interpretarea rezultatelor în schizofrenie.....	84
7.1.1.	Caracteristicile loturilor luate în studiu.....	84
7.1.2.	Analiza polimorfismelor <i>PON1</i> în schizofrenie.....	87
7.1.3.	Analiza activităților PON1 în schizofrenie.....	97
7.1.4.	Statusul PON1 în schizofrenie.....	116
7.1.5.	Analiza polimorfismelor <i>MTHFR</i> în schizofrenie.....	120
7.1.6.	Analiza homocisteinei plasmatice totale în schizofrenie.....	127

7.2.	Interpretarea rezultatelor în autism.....	141
7.2.1.	Caracteristicile loturilor luate în studiu.....	141
7.2.2.	Analiza polimorfismelor <i>PON1</i> în autism.....	143
7.2.3.	Analiza activităților <i>PON1</i> în autism.....	151
7.2.4.	Statusul <i>PON1</i> în autism.....	165
7.2.5.	Analiza polimorfismelor <i>MTHFR</i> în autism.....	171
7.2.6.	Analiza homocisteinei plasmatice totale în autism.....	175
8.	CONCLUZII.....	187
	REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	188
	ARTICOLE ANEXATE.....	212

CUVINTE CHEIE:

paraoxonaza, metilentetrahidrofolat reductaza, homocisteina, *PON1*, *MTHFR*, schizofrenie, autism

INTRODUCERE

Încă din deceniul trecut cercetările epidemiologice au semnalizat creșterea alarmantă la nivel mondial a frecvenței bolilor neuropsihice, în special a depresiei, schizofreniei și a autismului. În prezent, se consideră că atât prevalența schizofreniei cât și a autismului au ajuns la o valoare de 1%. În pofida cercetărilor epidemiologice, farmacologice și neurobiologice efectuate pe plan mondial cu scopul de a descifra mecanismele etiopatogenice ale acestor boli, schizofrenia și autismul sunt încă puțin înțelese. În acest sens, Eric Kandel, laureat al premiului Nobel, a afirmat că următorii 10 ani vor fi “magici” pentru cercetarea creierului, cu scopul de a elucida bazele neurobiologice ale bolilor neuropsihice. Impactul familial și social deosebit de important, precum și costurile enorme de îngrijire a acestor pacienți fac din cercetarea schizofreniei și a autismului o prioritate la nivel mondial. Asistăm în ultimii ani la o abordare mai comprehensivă a etiopatologiei acestor boli. Se investighează atât factorii de risc genetici și de mediu, cât și căile metabolice care ar putea fi alterate, precum și markerii biochimici specifici acestor boli.

În ultimul deceniu a devenit evident că atât tulburările din metabolismul homocisteinei, cât și alterarea activităților serice ale paraoxonazei-1, ambele asociate bolilor cardiovasculare, sunt implicate în etiopatogeneza mai multor boli neuropsihice. Cu toate acestea, în literatura de specialitate există doar câteva rapoarte științifice ale investigațiilor homocisteinei în relație cu polimorfismul metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR), sau a activităților arilesterazice și paraoxonazice ale paraoxonazei-1 în relație cu polimorfismele genei corespunzătoare (PON1), rezultatele fiind fie contradictorii, fie incomplete.

Cercetările care stau la baza lucrării de față s-au realizat în cadrul a 2 proiecte CEEEX cu titlul: “Markeri endofenotipici și susceptibilitate genetică în schizofrenie”, respectiv “Caracterizarea biochimică și genetică a metabolismului homocisteinei și a statusului redox în autism. Implicații terapeutice”, proiecte care, pentru prima dată, propun o abordare comprehensivă (clinică, biochimică, genetică și nutrițională) a particularităților metabolismului homocisteinei și a statusului redox în aceste patologii. Doresc să multumesc și pe această cale Doamnelor Prof. Dr. Doina Cosman și Conf. Dr. Maria Dronca, care în calitate de directori ale proiectelor mai sus menționate, mi-au oferit șansa de a colabora la aceste proiecte, respectiv de a realiza o parte dintre investigațiile genetice și biochimice aferente.

Lucrarea este structurată în 2 părți. Partea generală care cuprinde datele din literatura de specialitate legate de polimorfismele genelor MTHFR și PON1, homocisteină și paraoxonază-1 în schizofrenie și autism. Partea experimentală cuprinde scopul și obiectivele lucrării, apoi capitolele în care sunt prezentate materialele și metodele, rezultatele și discuțiile, urmate de concluzii și bibliografie.

5. OBIECTIVELE LUCRĂRII

Bolile neuropsihice sunt recunoscute în prezent a fi o cauză majoră de morbiditate ce afectează populația la nivel global. Încă din deceniul trecut cercetările epidemiologice au semnalat creșterea alarmantă la nivel mondial a frecvenței bolilor neuropsihice, în special a depresiei, schizofreniei și autismului. În prezent, se consideră că atât prevalența schizofreniei cât și a autismului a ajuns la o valoare de 1%. Conform statisticilor OMS (Organizația Mondială a Sănătății), România se află pe locul 5 în ceea ce privește incidența bolilor psihice în Europa.

În pofida cercetărilor epidemiologice, farmacologice și neurobiologice efectuate pe plan mondial cu scopul de a descifra mecanismele etiopatogenice ale acestor boli, schizofrenia și autismul sunt încă puțin înțelese. Impactul familial și social deosebit de important, precum și costurile enorme de îngrijire a acestor pacienți fac din cercetarea schizofreniei și a autismului o prioritate la nivel mondial. Asistăm în ultimii ani la o abordare mai comprehensivă a etiopatologiei acestor boli. Se investighează atât factorii de risc, genetici și de mediu, cât și căile metabolice care ar putea fi alterate, precum și markerii biochimici specifici acestor boli.

În ultimul deceniu a devenit evident că atât tulburările din metabolismul homocisteinei, cât și alterarea activităților serice ale paraoxonazei-1, ambele asociate bolilor cardiovasculare, sunt implicate în etiopatogeneza mai multor boli neuropsihice. Cu toate acestea, în literatura de specialitate există doar câteva rapoarte științifice ale investigațiilor homocisteinei în relație cu polimorfismul metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR), sau a activităților arilesterazice și paraoxonazice ale paraoxonazei-1 în relație cu polimorfismele genei corespunzătoare (PON1), rezultatele fiind fie contradictorii, fie incomplete.

Ne-am propus să investigăm acești factori de risc atât la adulții cu schizofrenie cât și la copiii cu autism; atât prin tematica aleasă cât și prin complexitatea sa, acest studiu este primul din România și unul dintre puținele din lume la ora actuală.

Obiectivele studiului sunt:

1. Determinarea polimorfismelor genelor paraoxonazei 1 (Q192R, M55L, -108C>T) și metilentetrahidrofolat reductazei (1298A>C, 677C>T) la pacienții cu schizofrenie comparativ cu lotul de control cu scopul de observa dacă există diferență semnificativ statistică între cele 2 loturi, care ar arata posibila implicare patogenetică a acestor polimorfisme în etiologia bolii;
2. Determinarea polimorfismelor genelor paraoxonazei 1 (Q192R, M55L) și metilentetrahidrofolat reductazei (1298A>C, 677C>T) la pacienții cu autism comparativ cu lotul de control cu scopul de observa dacă există diferență semnificativ statistică între cele 2 loturi, care ar arata posibila implicare patogenetică a acestor polimorfisme în etiologia bolii;
3. Evaluarea activităților ssPON-ase (paraoxonazică NaCl stimulată) și Ar-ase (arilesterazică) ale paraoxonazei-1, la pacienții cu schizofrenie și autism comparativ cu loturile de control, cu scopul de a observa dacă există diferențe semnificative statistic între loturi, ceea ce ar sugera o posibilă legătură între boală și PON1, precum și studiul influenței polimorfismelor genei PON1 asupra acestor activități în loturile studiate;

4. Determinarea nivelului plasmatic total al homocisteinei la pacienții schizofrenici și autiști comparativ cu loturile de control, cu scopul de a observa dacă există diferențe semnificative statistic între loturile studiate, ceea ce ar sugera implicarea Hcy în etiopatogenia acestor boli, precum și studiul influenței polimorfismelor genei MTHFR asupra nivelului Hcy plasmatice în loturile studiate.

REZULTATE □ I DISCU □ II

7.1.2.2. Analiza polimorfismului M55L în schizofrenie

Analizând cele 2 loturi separat s-a observat o diferență semnificativă statistic ($p < 0,05$) privind distribuția genotipurilor MM, ML și LL. Astfel în lotul de control predomină genotipul ML (Tabel 7.1.7, Figura 7.1.9).

Există diferență semnificativă statistic între loturi în ceea ce privește distribuția alelei M ($p < 0,05$; OR = 0,35; CI 95% = 0,15-0,82), dar nu și în ceea ce privește alela L ($p > 0,05$) (Tabel 7.1.8, Figura 7.1.10).

Tabel 7.1.7. Distribuția genotipurilor M55L în loturile investigate (pacienți vs control).

	MM	ML	LL	P
Control	6,12%	59,18%	34,69%	< 0,05
Pacienți	11,11%	28,57%	60,31%	

Tabel 7.1.8. Distribuția alelelor M55L în loturile investigate (pacienți vs control).

	MM&ML	LL	P	ML&LL	MM	P
Control	65,3%	34,69%	< 0,05	93,87%	6,12%	> 0,05
Pacienți	39,68%	60,31%		88,88%	28,57%	

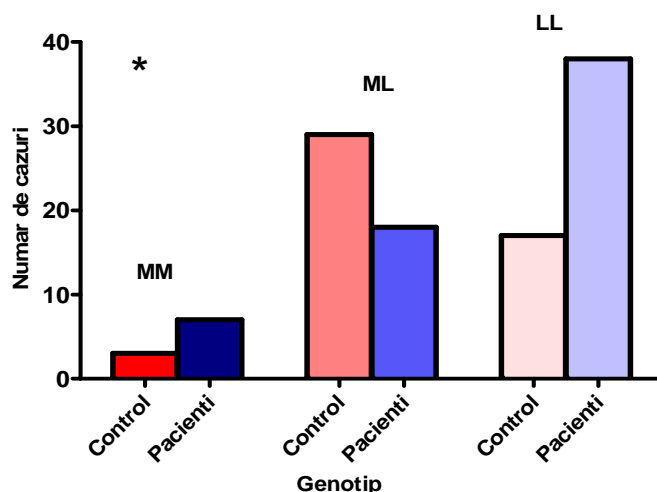


Figura 7.1.9. Distribuția genotipurilor M55L în loturile investigate (pacienți vs controli) (* $p < 0,05$).

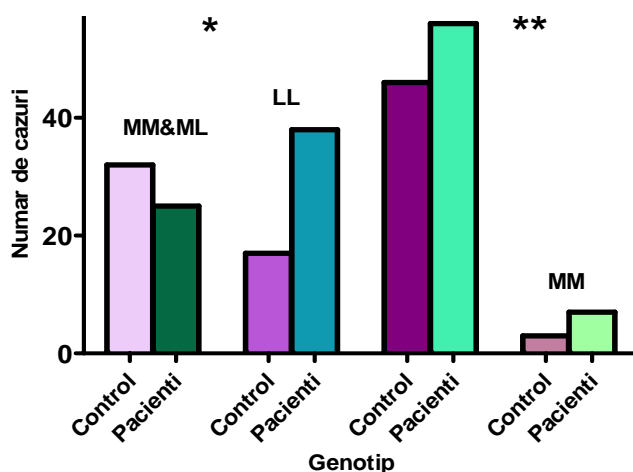


Figura 7.1.10. Distribuția genotipurilor și alelelor M55L în loturile investigate (pacienți vs controli) (* $p < 0,05$, ** $p > 0,05$).

7.1.3. Analiza activităților PON1 în schizofrenie

Analiza activității arilesterazice (Ar-ase) a arătat că valorile nu sunt normal distribuite ($p < 0,05$), existând o diferență semnificativă statistic între media valorilor corespunzătoare loturilor investigate ($p < 0,05$) (Tabel 7.1.15, Figura 7.1.15).

Tabel 7.1.15. Activitatea Ar-ase corespunzătoare loturilor investigate (pacienți vs controli).

Ar-ase (KU/l)	Control	Pacienti
Media	124,118	104,133
DS	46,342	29,612
P < 0,05 (0,046)		

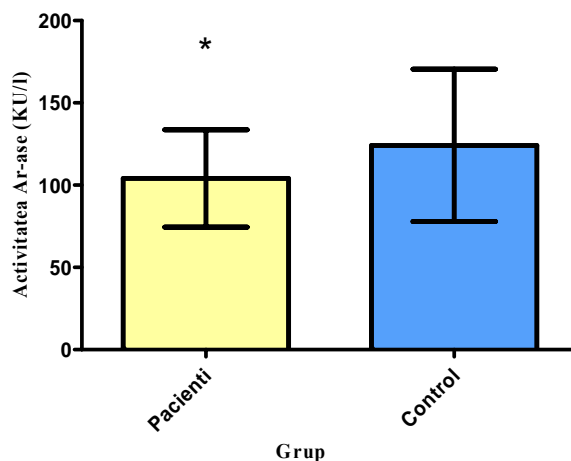


Figura 7.1.15. Activitatea Ar-ase corespunzătoare loturilor investigate (pacienți vs control). (* $p < 0,05$).

7.1.5.1. Analiza polimorfismului C677T în schizofrenie

Distribuția alelei T este diferită semnificativ ($p < 0,05$) la pacienți față de lotul de control (71,7% vs 32,4%), fiind în același timp un factor de risc pentru schizofrenie (OR = 5,3; CI 95% = 2,02-13,9) (Tabel 7.1.35, Figura 7.1.40).

Distribuția genotipurilor CC, CT și TT corespunzătoare lotului de schizofrenici este diferită semnificativ față de lotul de control ($p < 0,05$), dar acest lucru nu se datorează genotipului TT (13% vs 14,7%), ci genotipurilor CC (28,3% vs 67,6%) și CT (58,7% vs 17,6%) (Tabel 7.1.34, Figura 7.1.39).

Tabel 7.1.34. Distribuția genotipurilor C677T în loturile investigate (control vs pacienți).

C677T	Control	Pacienți
CC	67,6%	28,3%
CT	17,6%	58,7%
TT	14,7%	13%
P	< 0,05 (0,001)	

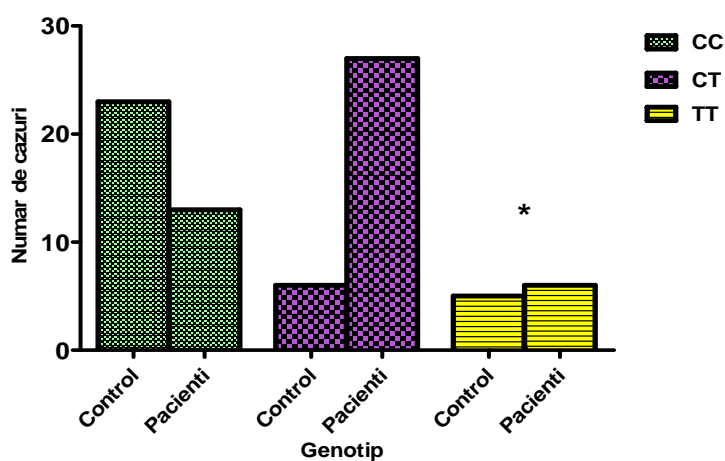


Figura 7.1.39. Distribuția genotipurilor C677T în loturile investigate (control vs pacienți) (* $p < 0,05$).

Tabel 7.1.35. Distribuția alelelor C677T în loturile investigate (control vs pacienți).

C677T	Control	Pacienți	P
CC&CT vs TT	85,3% vs 14,7%	87% vs 13%	> 0,05
CT&TT vs CC	32,4% vs 67,6%	71,7% vs 28,3%	< 0,05

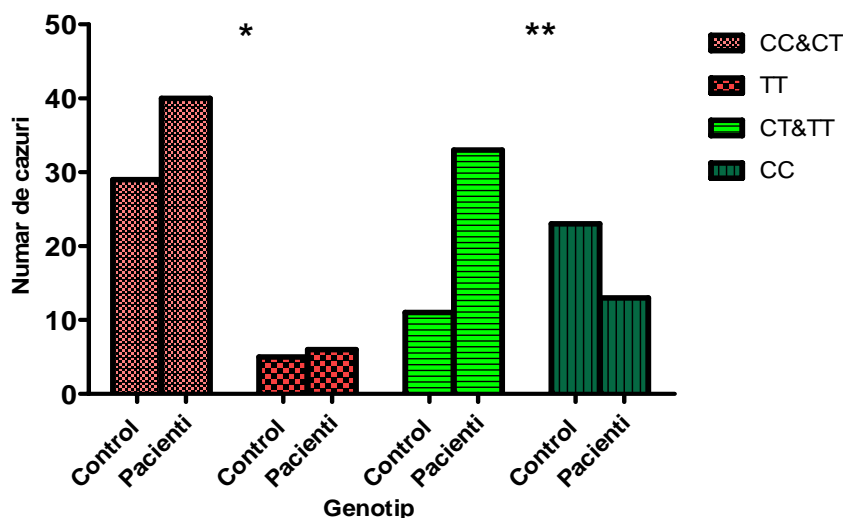


Figura 7.1.40. Distribuția alelelor C677T în loturile investigate (control vs pacienți) (* $p > 0,05$, ** $p < 0,05$).

7.1.6. Analiza homocisteinei plasmatice totale (tHcy) în schizofrenie

Analiza nivelului tHcy a arătat că nu există o diferență semnificativă statistic între lotul de pacienți și cel de control atât per global (pe ambele sexe) cât și doar în cazul sexului feminin ($p > 0,05$) (Tabel 7.1.39, Figura 7.1.44; Tabel 7.1.40, Figura 7.1.45), dar există o diferență semnificativă statistic între cele 2 loturi investigate pentru sexul masculin ($p < 0,05$) (Tabel 7.1.40, Figura 7.1.46); în ambele loturi investigate valorile se încadrează în limitele normale corespunzătoare vârstei.

Tabel 7.1.39. Nivelul tHcy în loturile investigate.

tHcy (micromol/l)	Control	Pacienți
Media	10,72	10,85
DS	3,38	4,27
P	> 0,05	

Tabel 7.1.40. Nivelul tHcy în lotul de control vs lotul de pacienți în funcție de sex.

tHcy (micromoli/l)	Sex feminin		Sex masculin	
	Control	Pacienți	Control	Pacienți
Media	9,02	10,76	12,49	10,9
DS	3,28	5,78	2,49	3,42
P	> 0,05		< 0,05 (0,02)	

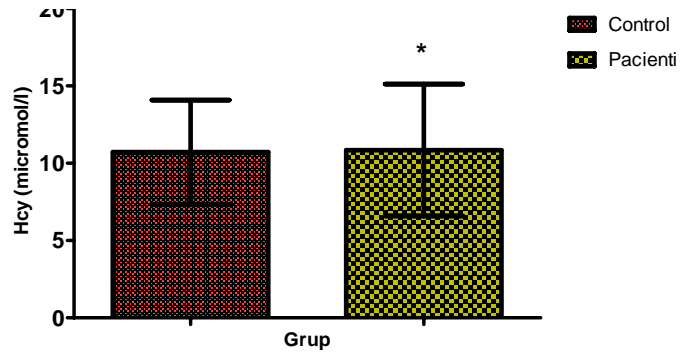


Figura 7.1.44. Nivelul tHcy în loturile investigate (*p > 0,05).

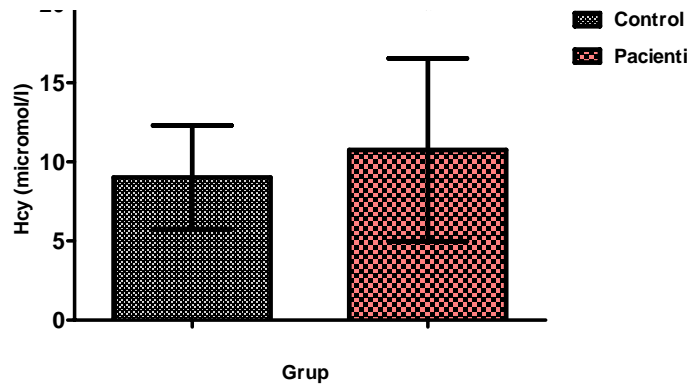


Figura 7.1.45. Nivelul tHcy corespunzător subiecților de sex feminin din loturile investigate. (*p > 0,05).

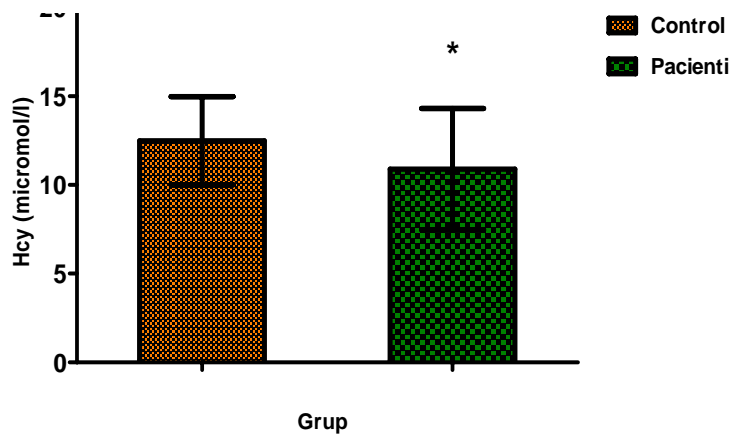


Figura 7.1.46. Nivelul tHcy corespunzător subiecților de sex masculin din loturile investigate. (*p < 0,05).

7.2.3. Analiza activităților PON1 în autism

Analiza activității arilesterazice (Ar-ase) a arătat o distribuție non-normală a valorilor ($p < 0,05$) cu o medie de 83,789 kU/l în grupul de control, respectiv de 70,437 kU/l în grupul de pacienți, existând o diferență semnificativă statistic între cele 2 loturi de studiu ($p < 0,05$) (Tabel 7.2.14, Figura 7.2.11).

Tabel 7.2.14. Activitatea Ar-ase în lotul de pacienți vs. lotul de control.

Ar-ase (KU/l)	Control	Pacienti	Distribuția valorilor în cele 2 loturi
Media	83,789	70,437	P < 0,05
DS	24,512	17,125	
P	< 0,05 (0,001)		

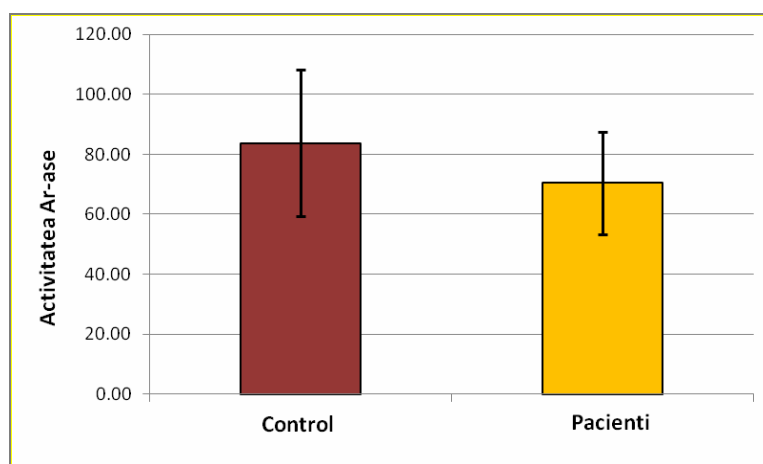


Figura 7.2.11. Activitatea Ar-ase în lotul de pacienți vs. lotul de control.

8. CONCLUZII

1. In ceea ce privește primul obiectiv, rezultatele arată că nu există diferență semnificativă statistic ($p > 0,05$) între subiecții schizofrenici și subiecții control privind polimorfismele PON1 Q192R și -108C>T; sau polimorfismul MTHFR 1298A>C; în schimb există diferențe semnificative ($p < 0,05$) între pacienții cu schizofrenie și controlii privind polimorfismul PON1 M55L și MTHFR 677C>T; deasemenea, există diferență semnificativă statistic ($p < 0,05$) între subiecții schizofrenici și subiecții control privind distribuția alelei T, aceasta fiind un factor de risc pentru schizofrenie.
2. Referitor la al doilea obiectiv al studiului, rezultatele au arătat că nu există diferență semnificativă statistic ($p > 0,05$) între subiecții autiști și subiecții control privind polimorfismele PON1 Q192R și M55L, sau MTHFR C677T.
3. Privind cel de-al treilea obiectiv al studiului, rezultatele au arătat că nu există diferență semnificativă statistic ($p > 0,05$) a activității P-ase între subiecții schizofrenici și subiecții control sau între subiecții autiști și subiecții control; există însă o diferență semnificativă statistic ($p < 0,05$) a activității Ar-ase între subiecții schizofrenici și subiecții control, respectiv între subiecții autiști și subiecții control.
4. In ceea ce privește al patrulea obiectiv, rezultatele au arătat că nu există diferență semnificativă statistic ($p > 0,05$) privind nivelul tHcy între subiecții schizofrenici și subiecții control sau între subiecții autiști și subiecții control; există însă o diferență semnificativă statistic ($p < 0,05$) între subiecții schizofrenici și subiecții control privind tHcy pentru sexul masculin.

CURRICULUM VITAE

NUME: Dronca

PRENUME: Eleonora

DATA NAȘTERII: 31.03.1978

TEL: 40-0740-366987

E-MAIL: nora_dronca@yahoo.com

EDUCAȚIE:

- Liceul Gh.Șincai, Cluj-Napoca - clasa de matematică-fizică, secția intensiv engleză (1992-1996);
- Facultatea de Medicină UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca (1996-2002);
- Medic stagiar în cadrul Spitalului Clinic Judetean, Cluj-Napoca (2002-2003);
- Masterat în Bioinformatică – Catedra de Informatică UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca (2002-2004);
- Masterat în Biologie celulară și Biotehnologie moleculară – Facultatea de Biologie a Universitatii Babes-Bolyai, Cluj-Napoca (2004-2005);
- Studii doctorale cu tema "Polimorfismul PON1 și MTHFR în autism și schizofrenie", în cadrul UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, Catedra de Genetică Medicală (2004-2008);
- Rezidentiat în specialitatea Genetica medicala (2009-prezent);

ACTIVITĂȚI ȘTIINȚIFICE:

- 2002-prezent: Colaborator al cercului științific studențesc al Catedrei de Biochimie medicală;
- 2005-prezent: Membru al Societății Române de Biochimie și Biologie Moleculară, filiala Cluj-Napoca;
- 2006-prezent: Membru al Societății Române de Genetica Medicala;
- 2010-prezent: Membru al Societății Europene de Genetică Medicală;
- 2005-2007: Colaborator în cadrul proiectului CEEX "Markeri endofenotipici și genetici în schizofrenie: analiza polimorfismului genelor MTHFR și PON 1; relația genotip –fenotip";
- 2006-2009: Colaborator în cadrul proiectului CEEX "Caracterizarea biochimică și genetică a metabolismului homocisteinei și a statusului redox în autism: analiza polimorfismului genelor MTHFR și PON 1; relația genotip –fenotip";
- 2006-2008: Colaborator în cadrul proiectului CEEX "Corelații între markeri biologici, aspecte clinice și terapie în depresia copilului și adolescentului";

- 2007-2010: Colaborator in cadrul proiectului CNMP-PNCIDI2 “Optimizarea diagnosticului precoce si tratamentul stenozei maligne de cai biliare utilizand ecografia intraductala cu miniprobe, tehnici microarray si terapia fotodinamica neoadjuvanta”;
- 2007-2010: Colaborator in cadrul proiectului CNMP-PNCIDI2 “Definirea profilului molecular transcriptomic in predictia statusului clinic in cancerile mamare rezistente la antracicline. Definirea bolii metastatice in raport cu tumora primara”;
- 2007-2010: Colaborator in cadrul proiectului CNMP-PNCIDI2 “Implementarea terapiei minim invazive in cancerul colorectal, optimizarea diagnosticului si prognosticului bolii corelate cu nivelul plasmatic al moleculelor angiogenice in relatie cu VEGF”.

LUCRĂRI COMUNICATE:

- **Dronca E.** 2001. “Activitatea paraoxonazei serice umane în DZ tip 1 cu sau fără complicații”. Sesiunea de Comunicări Științifice Studentești din cadrul Zilelor UMF “Iuliu Hațieganu”.

LUCRĂRI PUBLICATE *IN EXTENSO*:

- Dronca M, **Dronca E.** 2000. Produși intermediari și finali ai glicozilării neenzimatică avansate. Căi posibile de formare a “advanced glycosylation endproducts”. *Clujul Medical* LXXIII (2):173-181;
- Dronca M, Popa C, **Dronca E.** 2001. Diabetic monitoring by means of fructosamine, glycated haemoglobin and glycation quotient Glyc-Q. *Sibiul Medical* XII (3):346-348;
- Pașca SP, Nemeș B, Vlase L, Gagyi CE, **Dronca E.**, Miu AE, Dronca M. 2006. High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life Sciences* 78:2244-48;
- **Dronca E.**, Dronca M, Pop IV, Cosman D. 2007. Statusul PON1 in schizofrenie. *Clujul Medical* LXXX (2):336-341;
- **Dronca E.**, Kaucsar T, Pașca SP, Endreffy E, Iftene F, Pop IV, Dronca M. 2007. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in autism. *Annals of West University of Timisoara Series. The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology* 16(2):163-168;
- Kaucsar T, **Dronca E.**, Pașca S, Nemeș B, Endreffy E, Dronca M. 2007. Human serum paraoxonase 1 status in the Romanian population (in Hungarian). *Orvostudományi Ertesito (Bulletin of Medical Sciences)* 80(4):291-294;
- Burz C, Berindan Neagoe I, **Dronca E.**, Buiga R. 2008. Key signaling pathway in apoptosis. *Journal of the Romanian Society of Radiotherapy and Medical Oncology* 14(3):138-144;
- Pașca S, **Dronca E.**, Kaucsar T, Craciun E, Endreffy E, Ferencz B, Iftene F, Benga I, Cornean R, Banerjee R, Dronca M. 2009. One carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(10): 4229-4238;

- Hotoleanu C, Dronca M, **Dronca E**, Rusu R, Andercou A. 2009. Hiperhomocisteinemia – factor de risc in trombozele venoase profunde. Un studiu de tip caz-control. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii Medicilor si Naturalistilor* 113(1):68-73;
- Kaucsar T, Pașca S, Ferencz B, Chira S, Lupan I, **Dronca E**, Nemeș B, Iftene F, Dronca M. 2009. Investigation of the paraoxonase 1 (PON1) promoter polymorphism C(-108)T and activities in autism spectrum disorders. *Romanian Journal of Biochemistry* 46(1):13–23;
- Pașca S, **Dronca E**, Kaucsar T, Endreffy E, Iftene F, Benga I, Cornean R, Dronca M. 2010. Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(3): 600-607.

LUCRARI PUBLICATE IN VOLUM DE REZUMATE:

- Dronca M, Pasca SP, Nemes B, Vlase L, Gagyi CE, **Dronca E**. 2005. High level of plasma homocysteine in children with autism. *Haematologic Reports* 1(3):52;
- Dronca M, Gagyi-Craciun CE, **Dronca E**, Pasca SP, Nemes B. 2005. Activitatile paraoxonazei si glutation peroxidazei in autism. *Zilele UMF „Iuliu Hațieganu”*. *Volum de rezumate*: 20-21;
- Militaru MS, Popp RA, **Dronca E**, Pop IV, Militaru M. 2006. Deletion of the short arm of chromosome 18-case presentation. *European Journal of Human Genetics* 14(1):121;
- **Dronca E**, Dronca M, Nemes B, Cosman D. 2006. Statusul PON1 in schizofrenie. *Al II-lea Congres National de Genetica Medicala*. *Volum de rezumate*: 21-22.

LIMBI STRĂINE:

- Engleza :
 - Foarte bine;
 - Atestat CAE (calificativ A) obtinut in 2007.
- Franceza:
 - Bine.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
"IULIU HAȚIEGANU" Cluj-Napoca
FACULTY OF MEDICINE**

PHD THESIS ABSTRACT

**POLIMORPHISM OF PON1 AND MTHFR IN AUTISM
AND SCHIZOPHRENIA**

SCIENTIFIC ADVISOR:

PROF. DR. IOAN VICTOR POP

CANDIDATE:

ELEONORA DRONCA

2010

CONTENTS

PG.

PART I

GENERAL DATA

INTRODUCTION.....	1
2. SCHIZOPHRENIA.....	4
2.1. Definition and clinical aspects.....	4
2.2. Epidemiology.....	4
2.3. Endophenotypes.....	4
2.4. Etiopathology.....	5
1.4.1. Genetic factors.....	5
1.4.1.1. Chromosomal abnormalities.....	5
1.4.1.2. Candidate genes.....	8
1.4.2. Biochemical factors.....	12
1.4.3. Other factors.....	13
3. AUTISM.....	15
3.1. Definition.....	15
3.2. Diagnostic criteria and clinical symptoms.....	15
3.3. Epidemiology.....	16
3.4. Endophenotypes.....	16
3.5. Etiopathology.....	17
2.5.1. Genetic factors.....	18
2.5.1.1. Chromosomal abnormalities.....	20
2.5.1.2. Candidate genes.....	21
2.5.2. Other factors.....	25
2.5.2.1. Metabolic anomalies.....	25
2.5.2.2. Immune and clotting anomalies.....	28
4. PARAOXONASE.....	29
4.1. Structural and functional characterization.....	29
4.2. <i>PONI</i> polymorphisms.....	33
3.2.3. SNPs in the promoter region.....	33
3.2.4. SNPs in the coding region.....	34
4.3. Other factors.....	34

4.4.	PON1status	35
4.5.	PON1 in autism.....	35
4.6.	PON1 on schizophrenia.....	36
5.	HOMOCYSTEINA AND MTHFR.....	37
5.1.	Definition and role in different disorders.....	37
5.2.	Homocysteine metabolism.....	37
5.3.	Regulation of homocysteine metabolism.....	39
5.4.	Types of plasma homocysteine.....	40
5.5.	Total homocysteine. Normal range. Hiperhomocysteinemia.	40
	4.5.1. Factors influencing the level of homocysteinemia	41
	4.5.2. <i>MTHFR</i> polymorphisms.....	42
4.6.	Altered homocysteine metabolism in neuropsychiatric disorders.....	45
4.6.1.	Homocysteine neurotoxicity	45

PART II
EXPERIMENTAL DATA

5.	STUDY OBJECTIVES.....	50
6.	MATERIALS AND METHODS.....	52
6.6.	Patients and control groups.....	52
6.7.	Assaying total plasma homocysteine.....	52
6.8.	PON1activities	56
6.9.	<i>MTHFR</i> and <i>PON1</i> polymorphisms.....	59
6.10.	Statistical analysis.....	83
7.	RESULTS AND DISCUSSIONS.....	84
7.2.	Schizophrenia results.....	84
	7.1.1. Patients and controls groups.....	84
	7.1.2. <i>PON1</i> polymorphisms in schizophrenia.....	87
	7.1.3. PON1activities in schizophrenia.....	97
	7.1.4. PON1 status in schizophrenia.....	116
	7.1.5. <i>MTHFR</i> polymorphisms in schizophrenia	120
	7.1.6. Total plasma homocysteine in schizophrenia.....	127
7.2.	Autism results.....	141

7.2.1. Patients and controls groups	141
7.2.2. <i>PON1</i> polymorphisms in autism.....	143
7.2.3. <i>PON1</i> activities in autism.....	151
7.2.4. <i>PON1</i> status in autism.....	165
7.2.5. <i>MTHFR</i> polymorphisms in autism.....	171
7.2.6. Total plasma homocysteine in autism.....	175
9. CONCLUSIONS.....	187
BIBLIOGRAPHY.....	188
PUBLISHED PAPERS.....	212

Key words:

paraoxonase, methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine, *PON1*, *MTHFR*, schizophrenia, autism

INTRODUCTION

Since the last decade epidemiological investigations have flagged the alarming worldwide increasing frequency of neuropsychiatric diseases, especially depression, schizophrenia and autism. Currently, it is considered that both schizophrenia and autism prevalence have reached a value of 1%. Despite the epidemiological, pharmacological and neurobiological investigations conducted worldwide in order to decipher the etiopathogenic mechanisms of these diseases, schizophrenia and autism are still poorly understood. In this regard, Eric Kandel, a Nobel laureate, said that the next 10 years will be "magical" for brain research aimed to elucidate the neurobiological basis of neuropsychiatric diseases.

Family and social impact of great importance and the enormous costs of caring for these patients make the schizophrenia and autism research a worldwide priority. In recent years we have witness a more comprehensive approach of the etiology of these diseases. Both genetic and environmental risk factors, together with the altered metabolic pathways and the specific biochemical markers of these diseases are being investigated.

In the last decade it has become clear that both disorders of homocysteine metabolism, as well as altered serum paraoxonase activities, both associated with cardiovascular disease, are involved in the etiopathology of several neuropsychiatric diseases. However, at present there are few scientific reports about the relation between homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (MTHFR), or between the activities of paraoxonase 1 and paraoxonase-1 gene polymorphisms and all of these results are either contradictory or incomplete.

The research underlying this thesis was performed within two CEEEX projects entitled: "Endophenotype markers and genetic susceptibility to schizophrenia" and "Biochemical and genetic characterization of homocysteine metabolism and redox status in autism. Therapeutic implications", projects that were proposing a comprehensive approach (clinical, biochemical, genetic and nutritional) of the homocysteine metabolism and redox status in these disorders.

I wish to thank again to Prof. Dr. Doina Cosman and Associate Prof. Dr. Mary Dronca who, as directors of the projects mentioned above, gave me the chance to collaborate and work on these projects.

The paper is structured into two parts. The general data section which includes data from literature related to MTHFR and PON1 polymorphisms, homocysteine and paraoxonase-1 in schizophrenia and autism. The experimental section includes the objectives of the work, materials and methods, results and discussions, followed by conclusions and references.

5. STUDY OBJECTIVES

Neurological diseases are now recognized to be a major cause of morbidity affecting people globally. Since the last decade, epidemiological investigations have reported an alarming worldwide increase of the frequency of neuropsychiatric diseases, especially depression, schizophrenia and autism.

Currently, it is considered that both the prevalence of autism and schizophrenia have reached a value of 1%. According to WHO statistics (World Health Organization), Romania ranks 5 in the chart incidence of mental diseases in Europe.

In the last decade it has become clear that disorders of homocysteine metabolism, and altered serum activities paraoxonase-1, both associated with cardiovascular disease, are involved in the etiopathology of several neuropsychiatric diseases. However, at present there are few scientific reports about the relation between homocysteine and the methylentetrahydrofolate reductase polymorphism (MTHFR), or between the activities of paraoxonase 1 and paraoxonase-1 gene polymorphisms and all of these results are either contradictory or incomplete.

We aimed to investigate both risk factors in adults with schizophrenia and in children with autism; so the chosen theme and its complexity makes this study the first in Romania and one of the few in the world today.

Study objectives are:

1. Identification of paraoxonase 1 (Q192R, M55L,-108C> T) and methylentetrahydrofolate reductase (1298> C, 677C> T) gene polymorphisms in patients with schizophrenia and their matched controls, searching for a possible involvement of these polymorphisms in the etiology of the disease;
2. Identification of paraoxonase 1 (Q192R, M55L) and methylentetrahydrofolate reductase (1298> C, 677C> T) gene polymorphisms in patients with autism and their matched controls, searching for a possible involvement of these polymorphisms in the etiology of the disease;
3. Assay of the the ssPON-ase (salt stimulated paraoxonase) and Ar-ase (arylesterase) activities of PON1 in patients with schizophrenia and autism and their matched controls, searching for significant differences between groups, which would suggest a possible link between the disease and PON1;
4. Assay of the plasma total homocysteine levels in patients with schizophrenia and autistic and their matched controls, searching for significant differences between the groups, which would suggest the involvement of homocysteine in the etiopathology of these diseases.

RESULTS AND DISCUSSIONS

7.1.2.2. M55L polymorphism analysis in schizophrenia

Analyzing the two groups separately we observed a significant difference ($p < 0.05$) in the distribution of MM, ML and LL genotypes (Table 7.1.7, Figure 7.1.9).

There is a statistically significant difference between groups in the distribution of the M allele ($p < 0.05$, OR = 0.35, CI 95% = 0.15 to 0.82) but not of the allele L ($p > 0.05$) (Table 7.1.8, Figure 7.1.10).

Table 7.1.7. M55L genotypes (patients vs. controls).

	MM	ML	LL	P
Controls	6,12%	59,18%	34,69%	< 0,05
Patients	11,11%	28,57%	60,31%	

Table 7.1.8. M55L alleles (patients vs. controls).

	MM&ML	LL	P	ML&LL	MM	P
Controls	65,3%	34,69%	< 0,05	93,87%	6,12%	> 0,05
Patients	39,68%	60,31%		88,88%	28,57%	

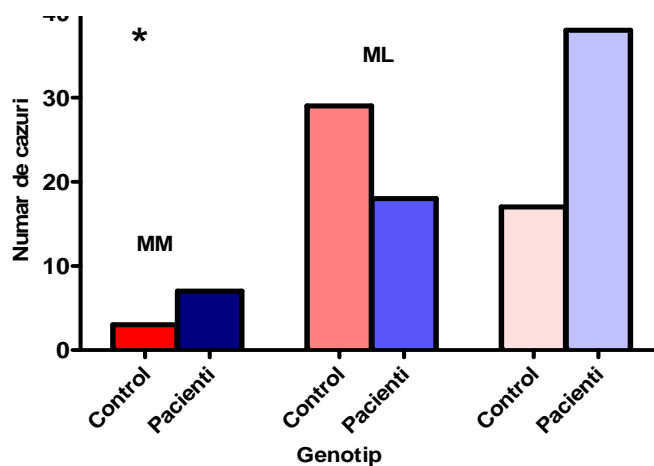


Figure 7.1.9. M55L genotypes (patients vs. controls) (* $p < 0,05$).

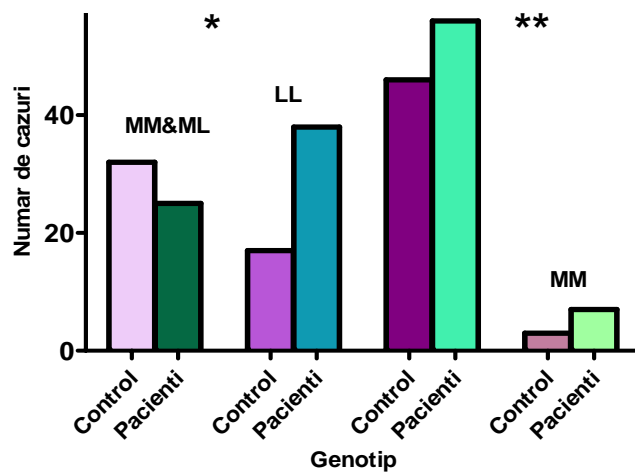


Figure 7.1.10. M55L alleles and genotypes (patients vs. controls) (* $p < 0,05$, ** $p > 0,05$).

7.1.3. Analysis of PON1 activity in schizophrenia

Analysis of the arylesterase activity (Ar-ase) showed that values are not normally distributed ($p < 0.05$), with a statistically significant difference between the average corresponding values in investigated groups ($p < 0.05$) (Table 7.1.15, Figure 7.1 .15).

Table 7.1.15. Ar-ase in controls vs. patients.

Ar-ase (KU/l)	Controls	Patients
Average	124,118	104,133
DS	46,342	29,612
P < 0,05 (0,046)		

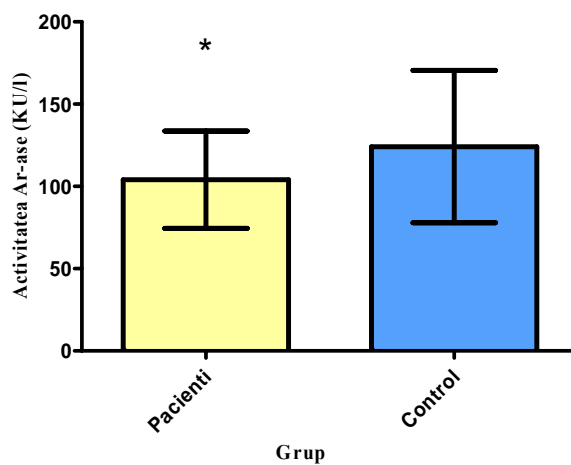


Figure 7.1.15. Ar-ase in controls vs. patients (* $p < 0,05$).

7.1.5.1. C677T polymorphism analysis in schizophrenia

T allele distribution is significantly different ($p < 0.05$) in patients compared to the control group (71.7% vs. 32.4%), while being a risk factor for schizophrenia (OR = 5.3, CI 95% = 2.02-13.9) (Table 7.1.35, Figure 7.1.40).

The distribution of CC, CT and TT genotypes corresponding in schizophrenic patients is significantly different from the control group ($p < 0.05$), and this is not due to the TT genotype (13% vs. 14.7%), but to the CC (28.3% vs. 67.6%) and CT (58.7% vs. 17.6%) genotypes (Table 7.1.34, Figure 7.1.39).

Table 7.1.34. C677T genotypes (controls vs. patients).

C677T	Controls	Patients
CC	67,6%	28,3%
CT	17,6%	58,7%
TT	14,7%	13%
P	< 0,05 (0,001)	

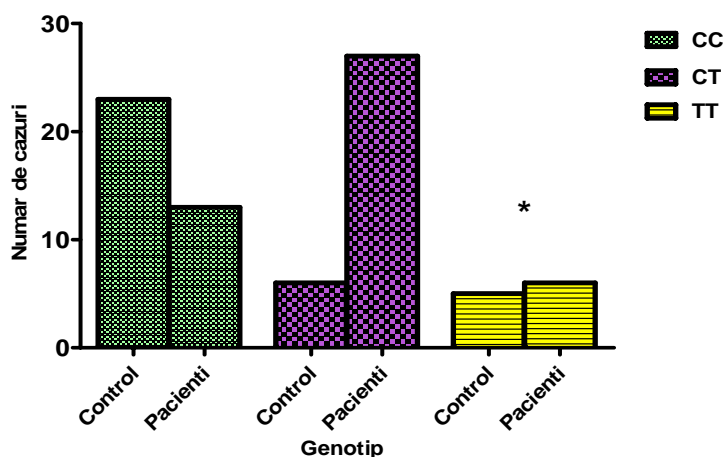


Figure 7.1.39. C677T genotypes (controls vs. patients) (* $p < 0,05$).

Table 7.1.35. C677T alleles (controls vs. patients).

C677T	Controls	Patients	P
CC&CT vs TT	85,3% vs 14,7%	87% vs 13%	> 0,05
CT&TT vs CC	32,4% vs 67,6%	71,7% vs 28,3%	< 0,05

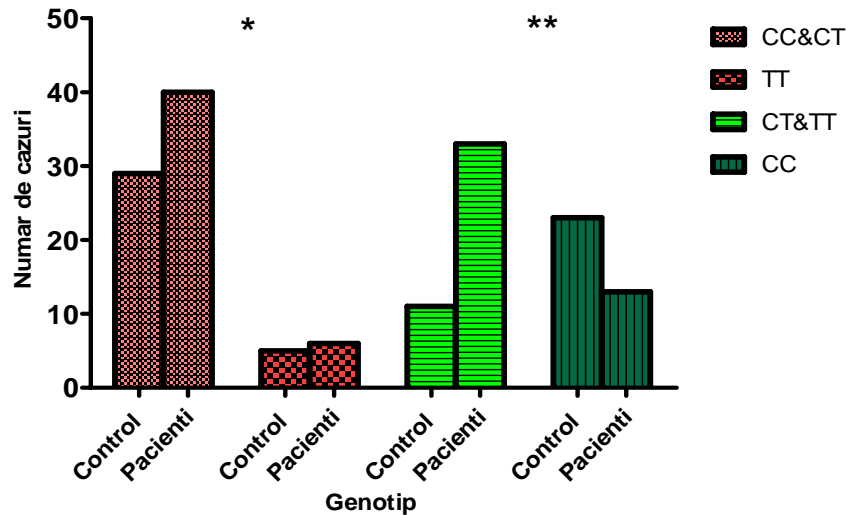


Figure 7.1.40. C677T alleles (controls vs. patients) (* $p > 0,05$, ** $p < 0,05$).

7.1.6. Analysis of total plasma homocysteine (tHcy) in schizophrenia

tHcy level analysis showed that there is no statistically significant difference between patients group and controls, both totally (both sexes) and only for females ($p > 0,05$) (Table 7.1.39, Figure 7.1.44, Table 7.1.40, Figure 7.1.45); there is a statistically significant difference between the two investigated groups for males ($p < 0,05$) (Table 7.1.40, Figure 7.1.46); in both investigated groups tHcy values were within the normal age-appropriate range.

Table 7.1.39. tHcy in patients vs. controls.

tHcy (micromol/l)	Controls	Patients
Average	10,72	10,85
DS	3,38	4,27
P	> 0,05	

Table 7.1.40. tHcy in males and females (patients vs. controls).

tHcy (micromoli/l)	Females		Males	
	Controls	Patients	Controls	Patients
Average	9.02	10,76	12,49	10,9
DS	3,28	5,78	2,49	3,42
P	> 0,05		< 0,05 (0,02)	

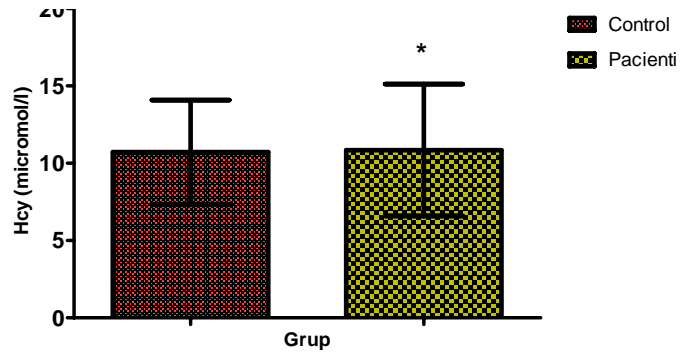


Figure 7.1.44. tHcy in patients vs. controls (*p > 0,05).

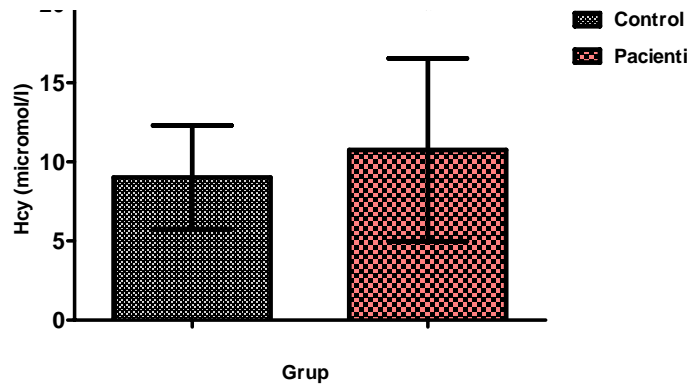


Figure 7.1.45. tHcy in females (patients vs. controls) (*p > 0,05).

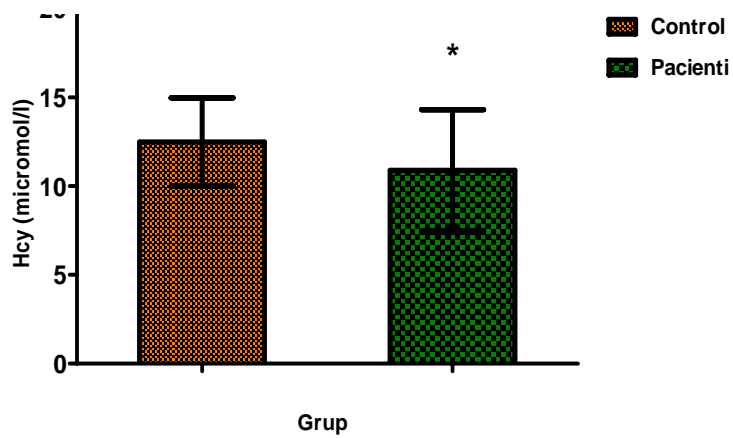


Figure 7.1.46. tHcy in males (patients vs. controls). (*p < 0,05).

7.2.3. PON1 activities in autism

Analysis of the arylesterase activity (Ar-ase) showed a non-normal distribution of values ($p < 0.05$), with a statistically significant difference between the two investigated study groups ($p < 0.05$) (Table 7.2.14, Figure 7.2.11).

Table 7.2.14. Ar-ase activity in patients vs. controls.

Ar-ase (KU/l)	Controls	Patients
Average	83,789	70,437
DS	24,512	17,125
P	< 0,05 (0,001)	

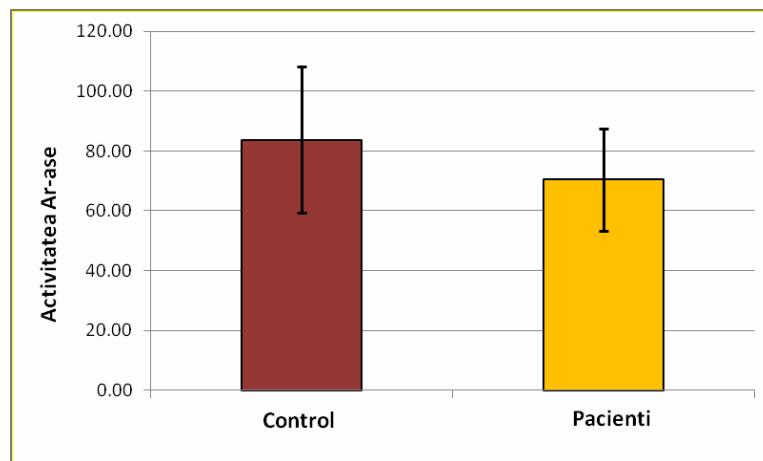


Figure 7.2.11. Ar-ase activity in patients vs. controls.

8. CONCLUSIONS

1. Regarding the first objective, the results show that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) between schizophrenic patients and controls for Q192R and PON1-108C > T or MTHFR 1298 > C polymorphisms; however there are significant differences ($p < 0.05$) between patients with schizophrenia and controls for the PON1 M55L and MTHFR 677C > T polymorphisms; also, there is a statistically significant difference ($p < 0.05$) between schizophrenic patients and controls for the distribution of T allele, which is a risk factor for schizophrenia.
2. Regarding the second objective of the study, results showed that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) between autistic patients and controls for PON1 Q192R and M55L or MTHFR C677T polymorphisms.
3. For the third objective of the study, results showed that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the activity of P-ase in patients with schizophrenia and controls, or between autistic patients and controls; but there is a significant difference ($p < 0.05$) in the Ar-ase activity between schizophrenics and controls, and between autistic patients and controls.
4. For the last objective, the results showed that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) for the tHcy levels between schizophrenics and controls or between autistic patients and control subjects, but there is a statistically significant difference ($p < 0.05$) between schizophrenic male patients and controls.

CURRICULUM VITAE

Surname: DRONCA

First name: ELEONORA

Date of birth: 03/31/1978

Place of birth: Cluj-Napoca, Romania

Mobile phone: 004-0740-366987

E-mail: nora_dronca@yahoo.com

Education:

- Gh.Șincai High School, Cluj-Napoca - intensive English, mathematics-physics class, (1992-1996);
- University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" – Faculty of General Medicine, Cluj-Napoca (1996-2002);
- Junior doctor at the County Clinical Hospital, Cluj-Napoca (2002-2003);
- Master in Bioinformatics - Informatics Department, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca (2002-2004);
- Master of Cell Biology and Molecular Biotechnology - Babes-Bolyai University, Faculty of Biology, Cluj-Napoca (2004-2005);
- PhD studies on " Polymorphism of PON1 and MTHFR in autism and schizophrenia" - University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, Department of Medical Genetics (2004-2008);
- Residential specialty in Medical Genetics (2009-present);

Scientific activity:

- 2002-present: Student Research group at the Department of Medical Biochemistry;
- 2005-present: Member of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology
- 2006-present: Member of the Romanian Society of Medical Genetics;
- 2010: Member of the European Society of Medical Genetics
- 2005-2007: Collaborator in the CEEX project entitled "Endophenotype and genetic markers in schizophrenia: analysis of MTHFR and PON 1 gene polymorphisms; genotype-phenotype interaction";
- 2006-2009: Collaborator in the CEEX project entitled "Biochemical and Genetic Characterization of homocysteine metabolism and redox status in autism: analysis of MTHFR and PON 1 gene polymorphisms; genotype-phenotype interaction";
- 2006-2008: Collaborator in the CEEX project entitled "Correlations between biomarkers, clinical aspects and therapy in child and adolescent depression";

- 2007-2010: Collaborator in the CNMP-PNCID2 project entitled: “Optimization of early diagnosis and treatment of malignant biliary stenosis using intraductal ultrasonography with miniprbes, microarray techniques and neoadjuvant photodynamic therapy”;
- 2007-2010: Collaborator in the CNMP-PNCID2 project entitled “Defining the molecular transcriptome profile in predicting the clinical status in breast cancers resistant to anthracyclines. Definition of metastatic disease compared with primary tumor”;
- 2007-2010: Collaborator in the CNMP-PNCID2 project entitled “Implementation of minimally invasive therapy in colorectal cancer, optimizing the diagnosis and the prognosis correlated with plasma levels of angiogenic molecules in relation to VEGF”.

Oral presentations :

- **Dronca E.** 2001. “ Human serum paraoxonase activity in type 1 diabetes with and without complications”. Student Scientific Session.

Published papers:

- Dronca M, **Dronca E.** 2000. Intermediate and endproducts of advanced nonenzymatic glycosylation. Possible ways of formation of advanced glycosylation endproducts”. *Clujul Medical LXXIII* (2):173-181;
- Dronca M, Popa C, **Dronca E.** 2001. Diabetic monitoring by means of fructosamine, glycated hemoglobin and glycation quotient Glyc-Q. *Sibiul Medical XII* (3):346-348;
- Pasca SP, Nemes B, Vlase L, Gagy E, Dronca E, Miu AE, Dronca M. 2006. High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life Sciences* 78:2244-48;
- **Dronca E,** Dronca M, Pop IV, Cosman D. 2007. PON1 status in schizophrenia. *Cluj Medical LXXX* (2):336-341;
- **Dronca E,** Kaucsar T, Pasca SP, Endreffy E, Iftene F, Pop IV, Dronca M. 2007. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in autism. *Annals of West University of Timisoara Series. The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology* 16 (2):163-168;
- Kaucsar T, **Dronca E,** Pasca S, Nemes B, Endreffy E, Dronca M. 2007. Human serum paraoxonase 1 status in the Romanian population (in Hungarian). *Orvostudományi Értesítő (Bulletin of Medical Sciences)* 80 (4):291-294;
- Burz C, Berindan Neagoe I, **Dronca E,** Buiga R. 2008. Key pathway in apoptosis signaling. *Journal of the Romanian Society of Radiotherapy and Medical Oncology* 14 (3):138-144;
- Pasca S, **Dronca E,** Kaucsar T, Craciun E, Endreffy E, Ferencz B, Iftene F, Benga I, Cornean R, Banerjee R, Dronca M. 2009. One carbon metabolism disturbances and the MTHFR C677T gene polymorphisms in children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (10): 4229-4238;

- Hotoleanu C, Dronca M, **Dronca E**, Rusu R, Andercou A. 2009. Hiperhomocysteinemia - a risk factor for deep vein thrombosis. A case-control study. *Medical-Surgical Review of the Society of Physicians and Naturalists* 113 (1):68-73;
- Kaucsar T, Pasca S, Ferencz B, Chira S, Lupan I, **Dronca E**, Nemes B, Iftene F Dronca M. 2009. Investigation of the paraoxonase 1 (PON1) promoter polymorphism C(-108)T and activities in autism spectrum disorders. *Romanian Journal of Biochemistry* 46 (1):13-23;
- Pasca S, **Dronca E**, Kaucsar T, Endreffy E, Iftene F, Benga I, Cornean R, Dronca M. 2010. Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (3): 600-607.

Abstracts:

- Dronca M, Pasca SP, Nemes B, Vlase L, Gagy CE, **Dronca E**. 2005. High level of plasma homocysteine in children with autism. *Haematologic Reports* 1(3):52;
- Dronca M, Gagy-Craciun CE, **Dronca E**, Pasca SP, Nemes B. 2005. Paraoxonase and glutathion peroxidase activities in autism. *Zilele UMF „Iuliu Hațieganu”*. Abstract volume: 20-21;
- Militaru MS, Popp RA, **Dronca E**, Pop IV, Militaru M. 2006. Deletion of the short arm of chromosome 18-case presentation. *European Journal of Human Genetics* 14(1):121;
- **Dronca E**, Dronca M, Nemes B, Cosman D. 2006. PON1 status in schizophrenia. *The 2nd National Medical Genetics Conference*. Abstract volume: 21-22.

Foreign languages:

- English
 - Cambridge Advanced Certificate (A) in 2007;
- French