

Zárójelentés

„A szkizofrénia diagnosztizálására alkalmas perifériás genetikai marker azonosítása” c.

T 038373 számú OTKA témáról

2006

1. Bevezetés

Korunk egyik leggyakoribb pszichiátriai betegsége, a **szkizofrénia**, amelynek előfordulása az európai népességben megközelíti az 1 %-ot. A szkizofrénia epizódikusan előforduló pozitív (delúzió, hallucináció, paranoia, megnövekedett motoros aktivitás, agresszió) és tartós negatív (emócionális labilitás, koncentráció/figyelem hiánya, szociális izoláltság, katatónia) tünetekkel jellemezhető krónikus pszichiátriai betegség. Magyarországon a betegség kezelésének direkt és indirekt költségei kb.14.5-25.6 milliárd Ft –ra tehetőek évente [1990-es adat].

Napjainkban a szkizofrénia diagnózisa az összetett klinikai tünetek alapján történik. A klinikai gyakorlatban az Amerikai Pszichiátriai Társaság (APA) által kidolgozott, rendszeresen revideált DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) diagnosztikus szisztémája a mérvadó, amely a betegség kritériumaként a tünetek legalább hat hónapos fennállását is megköveteli (DSM-IV, Fourth Edition). Nagy szükség lenne tehát egy olyan biológiai ill. genetikai markerre, amely a betegség pontos és gyors diagnosztizálását tenné lehetővé, aminek következtében a betegek gyógyszeres kezelése időben elkezdődhetne és ezáltal a betegség súlyosbodása sok esetben elkerülhető lenne.

Vizsgálataink arra irányultak, hogy a szkizofrén elváltozásokra jellemző **perifériás genetikai markert** találjunk. Korábbi hipotézisünk az volt, hogy a szkizofrénia jellemző génexpressziós elváltozások minden valószínűség szerint a vérben (periferális limfocitákban) is megtalálhatóak, hiszen több, a központi idegrendszerben ingerület-átvivő anyagként szerepet játszó vegyület (dopamin, szerotonin, glutamát, prolin) ill. ezen vegyületek szintéziséhez és metabolizálásához szükséges fehérjét kódoló gén a limfocitákban is kifejeződik. Feltételezésünk beigazolódott, amikor a közelmúltban két

amerikai laboratóriumban is kimutatták, hogy a D₃ dopamin receptor génje szkizofrén betegek limfocitáiban nagyobb mértékben fejeződik ki, mint az egészséges egyedekében. Meggyőződésünk volt, hogy egy új molekuláris biológiai eljárással, a **DNS chip vizsgálattal**, - amely több ezer gén kifejeződésének egyidejű mennyiségi összehasonlítására alkalmas - a D₃ dopamin receptoron kívül, más gének kifejeződésében is találnánk olyan szignifikáns és jól reprodukálható különbségeket, amely a szkizofrén betegekre jellemző és ennek következtében ezek a gének a szkizofrénia genetikai markereként lennének alkalmazhatók. A szkizofrénia genetikai markereinek ismeretében, lehetőség nyílik már sikeresen alkalmazott molekuláris biológiai technikák (pl. kvantitatív RT-PCR) adaptálása révén a **szkizofrénia diagnózisára alkalmas eljárás kidolgozására**.

Human cDNS chipek létrehozása

A vállalt feladat megvalósításának első lépése human cDNS chipek létrehozása volt. A DNS chip készítés egyedi cDNS insertek amplifikálásával és tisztításával kezdődött. Az egyedi cDNS klónokat cDNS könyvtárak tartalmazták. Mi, a CLONTECH Laboratories által előállított human limfocita LexA Matchmaker cDNS könyvtárat használtuk egyedi cDNS minták amplifikálásához. Első lépésként egyedi baktérium klónokat izoláltunk. A gyárilag előkészített baktérium kultúrát megfelelő hígításban baktérium táptalajt tartalmazó (LB agar/100µg/ml Ampicillin) lemezre szélesztettünk, majd egyedi kolóniákat izoláltunk, melyeket 10% glicerinnel oldatot tartalmazó mikrotiter lemezekre oltottunk (100µl 10% glicerinnel/minta). A minták egy részét (5µl) PCR amplifikációra használtuk fel, nagyobb részét -80C⁰-on archiváltuk. Az egyedi klónok cDNS fragmenjeit vektor specifikus primereket használva (pB42AD forward 5'-CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG-3' és 5'-GACCAAACCTCTGGCGAAGAAGTC-3' reverse primer) PCR-rel (100µl végtérfogatban, 5µl glicerines baktérium szuszpenziót) amplifikáltuk. Az insertek jelenlétét a mintákban minden esetben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Azokat a mintákat, amelyekben nem kaptunk jelet illetve több jelet is kaptunk, a továbbiakban nem vettük figyelembe. A megsokszorozott DNS inserteket 1/10 térfogat 3M Na-acetát (pH.:

5,2) jelenlétében izopropanollal kicsaptuk, majd 70%-os etanolos mosás után megszárítottuk, 30 μ l 1 X spotting pufferben (900 mM Na₂HPO₄, 0.06% SDS) feloldottuk és mikrotiter lemezekon -20C⁰-on tároltuk. Összesen **4500 klónt** dolgoztunk fel, melyekből a DNS chip készítéséhez **3200 mintát** szelektáltunk és tároltuk.

Betegek

A betegek a Szegedi Tudományegyetem Pszichiátriai Klinikájának bentfekvő betegei közül, önkéntes alapon kerültek ki. Minden beteg alapos fiziológiai, neurológiai, valamint a kötelező laboratóriumi vizsgálatokon esett át. A pszichiátriai tünetek értékelése a pozitív és negatív tüneti skála (Positive and Negative Syndrome Scale, PNSS), a klinikai globális benyomások (Clinical Global Impression, CGI) és a működések globális megítélése (Global Assessment of Functioning, GAF scale) alapján történtek. A szkizofrénia diagnózisa a DSM-IV útmutatása alapján került meghatározásra.

Vizsgálataink során 13 gyógyszermentes (drug naïv) illetve gyógyszerrel hosszabb ideje (több mint 3 hónap) nem kezelt (drug free) szkizofrén beteget és 10 kontroll mintát elemeztünk. A beteg minták között 7 nő és 6 férfi (az életkor 23-67 év között volt, átlag 34 \pm 12), a kontrollok között 5 nő és 5 férfi mintát analizáltunk annak érdekében, hogy a szkizofréniára jellemző periferális genetikai markereket azonosítsunk. A kísérletek során sem a beteg sem az egészséges kontroll egyedek nem álltak sem antipszichotikus sem egyéb gyógyszeres kezelés alatt.

Vizsgálatok

Nagy felbontóképességű cDNS chip technológiát alkalmazva előzetes szűrést végeztünk annak érdekében, hogy a kontrollhoz képest eltérő expressziós mintázatú géneket azonosítsunk a beteg limfocitákban, melyeket a későbbiekben QRT-PCR-rel tovább analizálhatunk. 13 betegből és 10 kontroll egyedből származó kevert RNS populációt reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk és 3200 human cDNS klónt

tartalmazó chipre hibridizáltunk. A chipen szereplő klónok egyharmada humán limfocita könyvtárból származott. Azokat a pozitív klónokat, melyek kétszeresnél nagyobb overexpressziót vagy repressziót mutattak, megszekvenáltuk. Ismételt vizsgálatok eredményeként két gént fokozott expresszióját sikerült kimutatnunk. A D₂ dopamin receptor (DRD2) esetében 2.56 ± 0.26 -szeres, míg az inwardly rectifying kálium csatorna (Kir2.3) gén esetében 6.75 ± 2.3 -szeres gén túlműködést detektáltunk a kontrollhoz képest. A chip kísérletek alapján ezt a két gént választottuk ki további analízisre.

A 13 egyedi beteg és 10 egyedi kontroll RNS mintát cDNS-sé alakítottunk, majd génspecifikus primerek illetve TaqMan próba felhasználásával QRT-PCR reakciót futtattunk a cDNS templatokon. A normalizációhoz belső referenciaként a SybrGreen módszernél β -actin-t, míg a TaqMan próbán alapuló QRT-PCR-nél a hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) géneket használtuk.

Mindkét módszer esetében relatív mennyiségi analízissel, a Ct értékek és a reakció hatékonyságát figyelembe véve állapítottuk meg a kontrollhoz viszonyított pontos mennyiségi arányt, mindkét génre vonatkozólag. A relatív expressziós szintet a normalizált, egyedi beteg mintához tartozó Ct értékek és az 5 különböző nem szerinti normalizált átlag kontroll Ct értékek hányadosa mutatja. A relatív mennyiségi arányt Pfaffl módszerrel számoltuk ki. Ez a módszer lehetőséget ad a különböző hatékonysággal működő reakciók korrekt összehasonlítására.

Ahhoz, hogy meghatározzuk a DRD2 és a Kir2.3 gének kifejeződési szintjének varianciáját a kontroll egyedekben, külön vizsgáltuk a egyedi kontroll mintáknak az átlaghoz viszonyított relatív kifejeződési szintjét. Minden kontroll mintára meghatároztuk az egyedi normalizált Ct értéket és a 10 mintából képzett normalizált átlag Ct érték hányadosát. Ez a hányados, SybrGreen módszert használva, a DRD2 esetében 0,39 és 2,56, a Kir2.3 esetében 0,18 és 3,54 között, míg TaqMan próba alkalmazásával 0,55 és 2,42 illetve 0,67 és 2,92 között volt. Ezeket az értékeket figyelembe véve a háttér kifejeződési szinteket a DRD2 esetében 2,56 (SybrGreen) és 2,42 (TaqMan), míg a Kir2.3 esetében 3,54 (SybrGreen) és 2,92 (TaqMan) értékekben állapítottuk meg.

Unpaired Student's t-tesztet alkalmaztunk a limfocitákban található génextpressziós különbségek (szkizofrén betegek/egészséges kontroll) szignifikanciájának meghatározásához. Mind a DRD2, mind a Kir2.3 gén relatív expressziója szignifikánsan

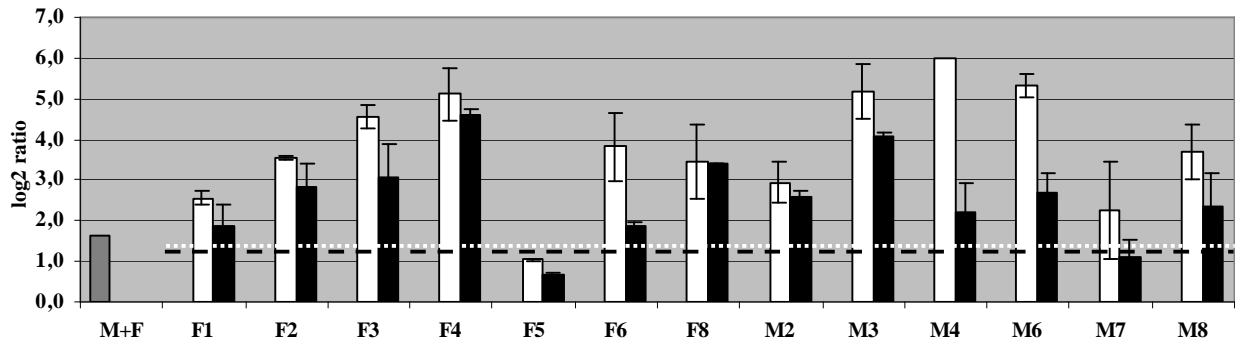
magasabb volt a betegek limfocitáiban az egészséges egyedekéhez viszonyítva, akár SybrGreen festéket, akár Taqman próbát alkalmaztuk ($p < 0.06$).

SybrGreen módszert használva - a kontroll minták relatív expresszióját alapul véve – a DRD2 gén túltermelését találtuk 6 szkizofrén férfi és 6 szkizofrén nő limfocitájában. Az overexpresszió mértéke az 5,7-szerestől a 64,7-szeres mértékig terjedt SybrGreen festéket alkalmazva (1. ábra, A). Egy női betegből származó limfocita esetén (F5) nem tudtunk a DRD2 gén szignifikáns túlműködését detektálni. Ebben az esetben a relatív génexpresszió mértéke 2,1-szeres volt, ami nem haladta meg a kontrollok relatív expressziós szintjét. A többi mintában a túlműködés átlagos mértéke SybrGreen festéket alkalmazva 21.4 ± 18.5 -szeres ($p = 0.0019$) volt (1. ábra, A). TaqMan próbát használva 6 nő és 5 férfi limfocitában detektáltuk a DRD2 gén túlműködését, amelynek mértéke ez esetben a 3,7-szeres értéktől a 24,1-szeres értékig terjedt. Egy férfi és egy nő beteg esetében (F5, M7) nem tudtuk a DRD2 gén szignifikáns túlműködését detektálni. Ezekben az esetekben a relatív génexpresszió mértéke 1,6-szeres volt az F5 jelű betegnél, és 2,2-szeres volt az M7 jelű betegnél. Ezek az értékek nem haladták meg a kontrollok relatív expressziós szintjét. Az átlag túlműködés mértéke TaqMan próbát alkalmazva 7.8 ± 6.3 -szeres ($p = 0.0023$) volt (1. ábra, A).

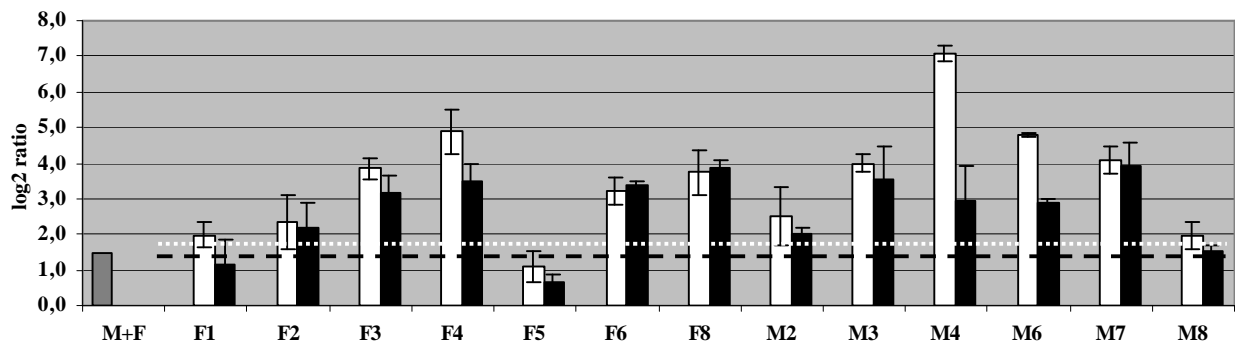
A 6 férfi és 6 nő beteg esetében a DRD2 gén mellett egy másik, a Kir2.3 gén túlműködését is kimutattuk a limfocitákban. A túlműködés mértéke, SybrGreen festéket alkalmazva, a kontrollokhoz viszonyítva a 4-szeres-től a 133,6-szeres értékig terjedt (1. ábra, B). Egy női betegből származó limfocitákban (F5) nem tudtunk a Kir2.3 gén szignifikáns túlműködését detektálni. Ebben az esetben a relatív génexpresszió mértéke 2,2-szeres volt, ami nem haladta meg a kontrollok relatív expressziós szintjét (1. ábra, B). A Kir2.3 gén overexpressziójának átlagos mértéke, SybrGreen festéket alkalmazva, 22 ± 34.7 -szeres ($p = 0.0535$) volt. A Kir2.3 overexpresszióját a beteg limfocitákban TaqMan próbán alapuló QRT-PCR-rel is ki tudtuk mutatni. 5 nő és 6 férfi betegből származó limfocitában detektáltuk a Kir2.3 túlműködését. Az overexpresszió mértéke az 2,8-szerestől a 15,8-szeres mértékig terjedt (1. ábra, B). A Kir2.3 gén overexpressziójának átlagos mértéke, TaqMan próbán alapuló QRT-PCR esetében, 8.2 ± 4.8 -szeres ($p = 0.0001$) volt. A két különböző QRT-PCR-rel kapott eredmények különbözősége a TaqMan

próbán alapuló módszer nagyobb érzékenységgel és nagyobb pontosságával magyarázható.

A.



B.



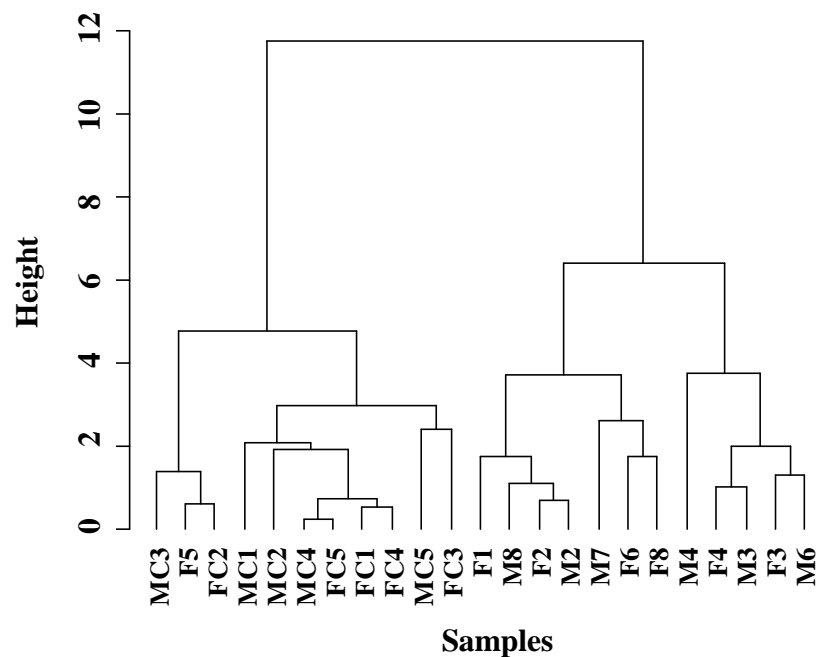
1. ábra. A DRD2 (**A**) és a Kir2.3 (**B**) gén relatív expressziója szkizofrén betegek limfocita mintáiban. Az arányok az Y tengelyen \log_2 -ban vannak kifejezve. A fehér oszlop a SybrGreen festett QRT-PCR, a fekete oszlop a Taqman próbával végzett eredményeket mutatja. A baloldali szürke oszlop a microarray adatokkal kapott relatív expressziót mutatja.

(**A**). A fehér pontozott vonal ($\log_2\text{ratio}=1.4$) és a fekete szaggatott vonal ($\log_2\text{ratio}=1.3$) a DRD2 gén kontrolokban mért alap expressziós értékét mutatja.

(**B**). A fehér pontozott vonal ($\log_2\text{ratio}=1.8$), és a fekete szaggatott vonal ($\log_2\text{ratio}=1.5$) a Kir2.3 gén kontrolokban mért alap expressziós értékét mutatja.

Az alap expresszió a kontrol egyedek génexpressziójának (DRD2 ill. Kirk2.3) átlaga. (M: férfi beteg, F: női beteg)

A génexpressziós adatokat felhasználva, csoport átlag (group average) módszeren alapuló agglomeratív hierarchikus klaszterezéssel a betegeket és a kontrollokat két külön csoportba tudtuk sorolni, mely egyértelműen mutatta a betegek és az egészséges kontrollok közötti szignifikáns különbséget (2. ábra). A módszer lényege, hogy a két klaszter közötti távolság az egyik illetve másik a klaszterben lévő pontok különbségének az átlaga. A különbségek kiszámításához az Euclides-féle távolságon alapuló (root sum-of-squares of differences) módszert alkalmaztuk. a különbségek kiszámításához.



2. ábra. A hierarchikus klaszter analízis az expressziós adatok alapján jól elkülöníthető két klasztert különít el. Az egyik csoportot a kontrollok, a másikat a betegek alkotják (a különös F5 minta kivételével). MC: férfi control, FC: női control, M: férfi beteg, F: női beteg.

Vizsgálatainkkal kimutattuk tehát, hogy az irodalomban eddig ismert DRD3 mellett, a DRD2 és a Kir2.3 gének kifejeződése is megváltozik szkizofrén betegek limphocitáiban, ezáltal ez a két gén is periferiás genetikai markere lehet a betegségnek. A két gén szkizofrénia diagnózisra történő felhasználását szabadalmazztattuk. Vizsgálataink értékét növeli, hogy az általunk vizsgált betegek nem álltak gyógyszeres kezelés alatt (drug naïv ill. drug free betegek), tehát a génexpressziós változások nem különböző gyógyszerhatások eredményei. Természetesen az eddig megvizsgált mintaszám kevés. A jövőben arra fektetjük a hangsúlyt, hogy az általunk kidolgozott és beállított real time PCR eljárással több tucat beteget vizsgáljunk meg és bizonyítsuk feltevésünket, hogy az itt leírt markergének alkalmasak a szkizofrénia korai diagnózisára.

A markergén felhasználásán alapuló diagnózis nemcsak gyorsabb és biztosabb lenne a jelenlegi módszereknél, hanem a korai diagnózis és az azt követő korai kezelés révén sok esetben megelőzhetővé tenné a betegség kialakulását, ill. nagymértékben javíthatná a betegség prognózisát.