

Zárójelentés

A D4-es dopamin receptor gén 5' régiójának haplotípus szerkezete: molekuláris és pszichiátriai vonatkozások (2003–2006)

F042730

Betegségeink kialakításában két fő etiológiai faktor, a környezeti hatások és a genetikai tényezők játszanak döntő szerepet. Ezek hozzájárulása a tünetek kialakításához eltérő mértékű, egyes szélsőséges esetekben kizárólag az öröklődés (pl. monogénes betegségek: enzimdefektusok) ill. máskor csak a környezeti faktorok (pl. balesetek) játszanak szerepet a tünetek megjelenítésében. A képzeletbeli skála két végpontja között azonban sok kórkép áll, melyek etiológiája összetett, legtöbb esetben több gén és a környezet együttesen felelős a rendellenesség kialakulásáért. Ezeket a betegségeket komplex jellegeknek nevezzük, ide tartoznak – többek között – a pszichiátriai kórképek is. A genetikai meghatározottság természetesen széles határok között változhat, ez fejezhető ki az ún. „heritabilitás” értékkel, amely megmutatja, hány százalékban járulnak hozzá örökletes faktorok egy adott kórkép kialakulásához. Ez az érték a Tourette-szindróma esetében – irodalmi adatok szerint – igen magas: 89–94%-ot is elér, mégis igen keveset tudunk pontosan azokról a genetikai polimorfizmusokról, melyek a betegség genetikai rizikófaktora lehetnek. Ezen információ ugyanakkor gyakorlati szempontból is kiemelkedő fontosságú, hozzájárulhat ugyanis a kórkép primer és szekunder prevenciójához valamint a hatékonyabb gyógyszeres kezelési protokollok kifejlesztéséhez.

A Gilles de la Tourette-szindrómát motoros és vocalis ticek hosszan (legalább 1 éven át) tartó fennállása jellemzi. A tünetek a felnőttkor elérése előtt jelentkeznek, és jellemzően hullámzó lefolyást mutatnak. A tic akarattól függetlenül, hirtelen jelentkező, gyors sztereotip mozgás (pl. pislogás) vagy hangadás (pl. krákogás, nyögés), ami naponta többször jelentkezhet, stressz fokozza, akarattal átmenetileg elnyomható. Manifesztációja alapján motoros vagy vocalis formáját különböztethetjük meg. A betegség hátterében a dopamin rendszer zavara tételezhető fel a központi idegrendszerben, ezt támasztja alá a dopamin antagonistá haloperidol terápiás hatékonysága is. A Tourette-szindróma genetikai hátterét kutató asszociáció vizsgálatok – ennek megfelelően – sok esetben a dopaminerg rendszer egyes kandidáns génjeit tanulmányozzák.

A dopaminerg rendszer egyik leggyakrabban vizsgált célpontja a D4-es dopamin receptor (DRD4) génje. Ennek egyik oka, hogy ezen receptorfehérje nagy mennyiségben fejeződik ki a prefrontális kéregben és a központi idegrendszer további területein, melyek az érzelmek, impulzusok kialakításában szerepet játszanak. Ismert továbbá számos olyan pszichiátriában eredményesen alkalmazott gyógyszer (atípusos antipszichotikumok, pl. clozapine), melyeknek ez a receptor az elsődleges célpontja. A DRD4 gén érdekessége ezen túlmenően, hogy mind a kódoló, mind az 5' szabályozó régió igen nagy számú genetikai variációt tartalmaz [Szantai, 2005, BMC Genet]. A gén egyik legtöbbet vizsgált polimorfizmusa a 3. citoplazmatikus hurok kódolásában szerepet játszó 48 bázispáros (bp-os) ismétlődési polimorfizmus. Napjaink-

ban ugyanakkor egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a gének 5' régiójában elhelyezkedő variációk elemzésére, melyek a képződő fehérje mennyiségére lehetnek hatással. **Munkánk egyik fő célja volt a DRD4 gén 5' régiójában elhelyezkedő** 120 bp-os duplikáció, -616CG, -615AG és -521CT egy pontos nukleotid (SNP) **polimorfizmusok vizsgálatára alkalmas hatékony genotipizáló és haplotipizáló eljárások kidolgozása** [Szantai, 2005, Psychiatr Genet; Ronai, 2004, Neuropsychiatr Genet, Szantai, 2005, J Chromatogr A]. Az SNP-k elemzése különösen a meglehetősen polimorf génszakaszok (mint amilyen a DRD4 gén is) esetében gondos körültekintést igényel, mivel az ismeretlen (vagy figyelmen kívül hagyott) genetikai variációk a vizsgálatot tévútra vihetik. Az SNP-k tanulmányozására ezért két egymástól független módszert alkalmaztunk: **RFLP-vel (restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus) valamint allél-specifikus amplifikációval határoztuk meg a vizsgált személyek genotípusát.** Az egymáshoz közel elhelyezkedő polimorfizmusok esetében az allélok relatív kromoszómális elhelyezkedése, azaz a haplotípus szerepe is feltételezhető, nem lényegtelen ugyanis, hogy két adott hatással rendelkező génváltozat azonos kromoszómán vagy épp ellenkezőleg az egyik az egyik, másik pedig a másik kromoszómán helyezkedik el. A haplotípus a családi genotípusok alapján, számítógépes módszerekkel valamint direkt, molekuláris technikákkal is meghatározható. A családi módszer hátránya, hogy bizonyos (pl. mindenki heterozigóta) családok esetében nem kivitelezhető. Ez nem csupán a vizsgálatba bevonható személyek számának csökkenése miatt jelent gondot, nagyobb probléma az, hogy a családok éppen „genotípusuk szerint” (a heterozigóták) esnek ki, azaz a vizsgált populáció összetétele torzul. A számítógépes megközelítés matematikai algoritmus segítségével becslést ad: a számítás rendszerint nem az egyes személyekre, sokkal inkább a teljes populációra végezhető el. A direkt molekuláris módszerek noha munkaigényesek, igen megbízható és minden személyre egyértelműen meghatározható eredményt adnak.

Haplotípus meghatározó módszert dolgoztunk ki a -616CG és a -521CT SNP-k együttes vizsgálatára, ez a technika továbbfejleszhető más gének elemzésére is. Ebben a rendszerben a DNS-fragmentumok elektroforetikus analízisét kapilláris gélelektroforézissel végeztük el [Szantai, 2004, J Chromatogr A]. **A haplotípus vizsgálatot a 120 bp-os duplikációra és az általunk leírt új -615AG SNP-re is kiterjesztettük,** így ebben a rendszerben a promotor régió 4 polimorfizmusát magában foglaló haplotípus szerkezet határozható meg. Ezek a módszerek megbízható eredményt adnak minden vizsgálati személy esetében. Elméleti szempontból legtöbb esetben a kromoszómák allél-specifikus PCR-en alapuló szétválasztása jelenti a kulcs lépést a folyamat során, melyet megfelelően megtervezett restrikciós emésztés ill. a keletkező fragmentumok elektroforetikus analízise követ. A kapott kép az alkalmazott primerek és endonukleázoknak megfelelően kiértékelhető, és a haplotípus ennek fényében azonosítható [Szantai, 2005, Psychiatr Genet].

Munkacsoportunk foglalkozik a DRD4 gén 5' régiójában lévő polimorfizmusok funkcionális jellemzésével is, mivel az egyes allélok génexpresszióra kifejtett eltérő hatása lehet az első lépcsőfok a genotípus–fenotípus összefüggés megértésében. A gén promotor régiójának különböző hosszúságú szakaszait luciferáz riportter rendszerben vizsgáltuk, a kísérle-

teket idegi eredetű neuroblasztóma, retinoblasztóma és HeLa sejtvonalakban végeztük el. A genotipizáló munka eredményeként azonosított allélváltozatok ill. irányított mutagenézis segítségével elkészítettük az egyes variációkat ill. az ezek haplotípusát tartalmazó vektorokat, s vizsgáltuk a 120 bp-os duplikáció, a -616CG, -615AG és a -521CT génexpresszióra gyakorolt hatását. Vizsgálataink szerint a 120 bp-os duplikáció dóziszfüggő módon befolyásolja a génexpressziót, minél több példányban fordult elő az ismétlődő 120 bp hosszúságú modul, annál kisebb transzkripció volt kimutatható. A haplotípusok funkcionális elemzése alapján kimutatható volt, hogy a 120 bp duplikáció rövidebb változata és a -521CT SNP T allélja együttesen kisebb aktivitással jellemezhető neuroblasztóma és retinoblasztóma sejtvonalakban is, bár ez a hatás elsősorban a 120 bp duplikáció jelenlétének köszönhető. Megfigyelhető volt még emellett, hogy a -616CG, -615AG és -521CT polimorfizmusok „GGC” haplotípusa kisebb aktivitást mutat a többi haplotípus kombinációnál. Mindezen eredmények megalapozottabb és biztosabb kiindulási pontot jelentenek a DRD4 gén 5' régiójának további *in vitro* (pl. EMSA – electrophoretic mobility shift assay) és *in vivo* (pl. kromatin immun precipitáció) vizsgálatához.

Bár a Tourette-szindróma kialakulásában a dopamin-rendszer zavarát tartják elsődlegesnek, emellett azonban a noradrenerg, szerotonerg és kolinerg rendszer érintettsége is feltételezhető. Ezt támasztják alá többek között azok a klinikai tapasztalatok, melyek az újabb atípusos antipszichotikumok (risperidon, olanzapin, ziprasidon) jobb tolerálhatóságát figyelik meg. Ezt a hatást kevert 5HT₂ / D₂-receptor antagonistáknak tulajdonítják. A dorsalis raphe mag szerotonerg neuronjai ugyanis rostokat küldenek a substantia nigra dopaminerg sejtjeihez, és 5HT₂-receptoron keresztül gátlást fejtenek ki azokon. Az atípusos neuroleptikumok 5HT₂-antagonista hatásuknak köszönhetően felszabadítják e gátlás alól a substantia nigra sejtjeit, így a nigrostriatalis szinapszisban a fokozottabb dopamin-felszabadulás valamelyest kompenzálni tudja a gyógyszer agytörzsi D₂-antagonista hatását. A szerotonin rendszer emellett még több más szinten is beavatkozik a bazális ganglionok működésébe. Mindezen elméleti megfontolások alapján, a dopamin rendszer mellett **a szerotonerg neurotranszmisszió fontosabb genetikai polimorfizmusait is bevontuk munkánkba.**

A szerotonerg rendszer legtöbbet vizsgált polimorfizmusai a szerotonin transzporter génjének 5' régiójában (5HT_{1pr}) és második intronjában (ST_{in2}) található ismétlődési polimorfizmusok, valamint a monoamino-oxidáz A (MAO-A) génben található VNTR (variable number of tandem repeat). Ezen polimorfizmusok feltételezhetően szerepet játszanak a megfelelő gének transzkripciójának szabályozásában. Az ismétlődési szám meghatározása polimeráz láncreakció ill. az azt követő gélelektroforézis alkalmazásával történt. A minták elemzése biztató eredményt adott: a MAO-A VNTR esetében a 3-szoros ismétlődést tartalmazó variációt szignifikánsan gyakoribbnak találtuk a kontroll csoporthoz képest [Kereszturi, 2005, WCPG].

Legújabb eredmények szerint a hagyományosan vizsgált genetikai polimorfizmusok (leggyakrabban SNP-k) mellett feltételezhetően egy más típusú genetikai variabilitás is döntő szerepet játszik az örökletes tulajdonságok genetikai meghatározásában. A *Nature*-ben 2005-

ben megjelent közlemény arról számol be, hogy meglehetősen hosszú – több százezer bázispár nagyságú –, több gént magában foglaló szakaszok inszerciója, delécioja, inverziója is nagy gyakorisággal megfigyelhető a humán genomban, ezeket a polimorfizmusokat CNV-nek, azaz génkópia szám polimorfizmusnak (copy number variation) nevezzük. A CNV-k egy régebb óta ismert példája az „RCCX”-modul ismétlődése a 6-os kromoszóma rövid karján az MHC III. osztály részeként, ahol négy gén – az RP (Ser–Thr kináz), a 21-hidroxiláz, a komplement C4-komponens és a tenascin-X (extracelluláris mátrix fehérje) – szorosan kapcsolt egységének különböző számú ismétlődése figyelhető meg. Funkcionális szempontból feltehetően a 21-hidroxiláz enzim valamint a C4 komplement fehérje génje kiemelkedő jelentőségű. Bár a 21-hidroxiláz gén a legtöbb esetben az ismétlődő elemek közül csak az egyikben aktív (a többiben pszeudogén), az ismétlődési szám valószínűleg ezen aktív gén működése szempontjából sem közömbös, a C4 gén pedig minden ismétlődő egységben aktív gént tartalmaz. A képet tovább tarkítja, hogy az egyes elemek mindegyike funkcionálisan is eltérő C4A ill. C4B gént tartalmazhat: a C4A és C4B fehérjék szérum szintje és a gének ismétlődési száma között egyértelmű kapcsolat mutatható ki. A C4A és C4B mennyiségének kiegyensúlyozatlansága számos immunrendszeri betegség (pl. systema lupus erythematosus) feltételezett hajlamosító tényezője, de emellett szerepe autizmusban és figyelemhiányos hiperaktivitásban – azaz pszichiátriai kórképekben – is felmerült.

Noha technikai szempontból ebben az esetben is ismétlődési polimorfizmusról van szó, az ismétlődő elem hossza lényegesen nagyobb annál, semhogy a hagyományos módszerrel (vizsgált szakaszt közrefogó primerekkel történő PCR-amplifikáció) az ismétlődési szám meghatározható legyen. A gén-dózis (gén szám) analízise ehelyett mennyiségi mérésen alapuló technikák felhasználásával történhet. Mivel **a C4A és C4B gének számlálására** az irodalomban ismert módszerek kis hatékonyságúak és nagy mennyiségű genomális DNS-t igényelnek, célul tűztük ki **hatékonyabb módszerek kidolgozását**. Ezen technikák modellként szolgálnak további CNV-k azonosításában és vizsgálatában is. Ennek megfelelően párhuzamosan két eljárást fejlesztettünk ki, melyek **real-time PCR** [Szilagyi, 2006, BMC Genet] ill. **kapilláris elektroforézis** [Szilagyi, 2006, Electrophoresis] **segítségével** határozzák meg a C4A és a C4B gének számát a vizsgált személyek genomjában.

A vizsgálatban résztvevő Tourette-szindrómában szenvedő betegektől, a biológiai szülőktől valamint a kontroll csoport tagjaitól non-invazív módon, a szájnyálkahártya vattapálcával történő rövid dörzsölésével DNS-mintát vettünk. A DNS tisztítását a hagyományos fenolkloroformos technikával ill. a fehérjék kiszórásán alapuló Gentra kit segítségével végeztük el. A vizsgált kandidáns gének polimorfizmusainak ill. azok haplotípusának elemzése a közleményekben ill. a fenti összefoglalóban bemutatott eljárásokkal történt.

A Tourette-szindróma genetikai rizikófaktorainak kutatása során az asszociáció vizsgálatok két megközelítési formáját alkalmaztuk. Az egyik módszer az ún. eset–kontroll vizsgálat, melynek lényege, hogy az egészséges és a beteg csoport allél- ill. genotípus gyakorisági értékeit összehasonlítjuk, és az esetleges szignifikáns eltérés esetén feltételezzük, hogy az adott allél-változat hozzájárul a betegség tüneteinek kialakításához. A másik technika a családokon

belüli allél-átadás vizsgálata (TDT – transmission disequilibrium test), mely azt vizsgálja, hogy családi triókban a heterozigóta szülők a kiszemelt kandidáns allélt gyakrabban adják-e át a beteg gyerekeknek.

A TDT vizsgálat a szerotonerg rendszerbe tartozó monoamino-oxidáz A gén 5' régiójában található ismétlődési polimorfizmus esetében ígéretes eredményt hozott. 42 szülő vizsgálata alapján megfigyelhető volt, hogy a **3x ismétlődési forma szignifikánsan gyakrabban adódik át a Tourette-szindrómában szenvedő gyermekeknek** a hosszabb variánsokhoz képest („genotípus szerinti” TDT: $p = 0,029$). A szerotonerg rendszer más általunk vizsgált kandidáns polimorfizmusa esetében (szerotonin transzporter 5' régiójában és 2. intronjában lévő VNTR) hasonló hatást nem figyeltünk meg.

A dopaminerg rendszer esetében az eset-kontroll megközelítés ($N = 103$ ill. $N = 284$) nem mutatott eltérést a vizsgált DRD4 gén polimorfizmusok (III. exon 48 bp VNTR, 120 bp-os duplikáció, -616CG, -615AG és -521 CT SNP-k) allél- ill. genotípus-gyakoriság értékeiben. TDT-vizsgálat keretében 71 családi triót és 23 duót vizsgáltunk, és **2x120 bp ~ -616G ~ -615A ~ -521C haplotípus preferenciális átadódását figyeltük meg**, bár az „allél-szerinti” TDT vizsgálatra vonatkozó eredmény nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét ($p = 0,054$).

Ismert tény, hogy a pszichiátriai kórképek többsége, ahogy a Tourette-szindróma is igen összetett, több különböző komponensből álló kórkép. Ez a genetikai asszociáció vizsgálatok során jelentős nehézség, mivel a komplex fenotípus genetikai háttere összetett, s a kis génhatások azonosítása nem könnyű feladat. Éppen ezért egy fontos új megközelítés a fenotípus jól mérhető alapelemeinek, az ún. endofenotípusoknak a vizsgálata, melyek örökletes komponenseinek azonosítása több sikerrel járhat. Ezen megközelítést alkalmaztuk munkánk során, és a Tourette-szindróma egyik alaptünetét a ticek súlyosságát külön is elemeztük. **Szignifikáns asszociációt találtunk a dopamin transzporter 3' régiójában lévő VNTR és a ticek súlyossága között:** azok a betegek, akik legalább egy 9 ismétlődést tartalmazó alléllal rendelkeztek (9x/9x ill. 9x/10x genotípus, $N = 49$) szignifikánsan súlyosabb tic tünetekkel rendelkeztek, mint a 9-es variánst nem hordozó (10x/10x genotípus, $N = 53$) betegek ($p = 0,002$).

Összefoglalva: **hatékony módszereket dolgoztunk ki a DRD4 gén ill. a tudomány fejlődésének megfelelően szóba kerülő más kandidáns gének ill. polimorfizmus típusok vizsgálatára. Ezen technikák alkalmazásával elvégeztük a tervezett genetikai asszociáció-vizsgálatokat Tourette-szindrómában szenvedő betegek körében, és olyan kandidáns polimorfizmusokat (monoamino-oxidáz 5' ismétlődő régió, dopamin transzporter 3' ismétlődő szakasz) azonosítottunk, melyek a kórkép genetikai rizikófaktorai lehetnek.**