

A DOPAMIN D4-ES RECEPTOR GÉNVARIÁNSOK VIZSGÁLATA FIGYELEMHIÁNYOS HIPERAKTIVITÁSI ZAVARBAN

Kereszturi Éva¹, Király Orsolya¹, Csapó Zsolt¹, Tárnok Zsanett², Gádoros Júlia², Sasvári-Székely Mária¹ és Nemoda Zsófia¹

¹Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

²Vadaskert Gyermekpszichiátriai Kórház és Szakambulancia, Budapest

Érkezett: 2007. márc. 02. Elfogadva: 2007. márc. 14.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dopamin D4-es receptor (DRD4) génjét a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (ADHD) egyik kandidáns génjeként tartja számon a szakirodalom. A gén 5' szabályozó (promoter) régiója és a kódoló szakasz egyaránt gazdag génvariánsokban, polimorfizmusokban. A DRD4 gén leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa a III. exonban található 48 bp VNTR (Variable Number of Tandem Repeats, hosszúság-polimorfizmus). A promoter régió változatait is egyre növekvő érdeklődés övezi a transzkripció (génátíródás) szabályozásában esetlegesen betöltött szerepük miatt. Munkánk során összefüggést kerestünk az ADHD előfordulása és a DRD4 gén promoterében található 120 bp duplikáció, valamint három egy pontos nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) között. Az eset-kontroll vizsgálat során a 120 bp duplikáció 1-szeres ismétlődési változata mind allél ($p=0,047$), mind pedig genotípus-frekvenciát ($p=0,019$) tekintve szignifikánsan gyakoribbnak mutatkozott az ADHD csoportban. A vizsgált SNP-k közül (-616 C/G, -615 A/G, -521 C/T) egyik sem mutatott szignifikánsan eltérő gyakoriságot a beteg és a kontroll csoport összehasonlításakor.

A 120 bp duplikáció DRD4 gén expressziójára gyakorolt hatását is megvizsgáltuk *in vitro* luciferáz riporter rendszerben. A hosszúság-polimorfizmus, melynek az 1-szeres és 2-szeres ismétlődési változata mellett egy 4-szeres formát is leírtunk, dózis-függő módon befolyásolta a DRD4 gén transzkripció aktivitását mind neuroblasztóma, mind retinoblasztóma sejtvonalban. Minél többször fordult elő a 120 bp-nyi szakasz a promoterben, annál erősebben csökkent a

gén transzkripciója (1-szeres > 2-szeres > 4-szeres ismétlődés; $p<0,01$).

Az asszociációs és funkcionális eredmények arra utalnak, hogy a 120 bp duplikáció 1-szeres ismétlődési formája az ADHD egy lehetséges rizikófaktorának tekinthető.

KULCSSZAVAK: dopamin D4-es receptor (DRD4), figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (ADHD), polimorfizmus, asszociáció-analízis

ANALYSIS OF THE DOPAMINE D4 RECEPTOR GENE VARIANTS IN ATTENTION DEFICIT HYPERACTIVITY DISORDER

The human dopamine D4 receptor (DRD4) gene has been extensively studied as a candidate gene for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Both the 5' regulatory region and the coding sequence contain a number of polymorphisms. The most widely investigated polymorphism of the DRD4 gene is the 48 bp VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) in the third exon. The promoter variants have received particular attention in the past few years due to their possible role in the regulation of gene expression. In this study we describe an association analysis of the 120 bp duplication and three sequence variations (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism; -616 C/G, -615 A/G, -521 C/T) in the 5' region of the DRD4 gene is presented among children with ADHD. In case-control approach, the 1-repeat form of the 120 bp duplication had a significantly higher frequency among ADHD children than controls, both in allele ($p=0.047$), and genotype ($p=0.019$) distributions. There was no significant difference between the ADHD and control groups in the allele or genotype frequencies of the investigated SNPs.

The transcriptional effect of the 120 bp duplication was analysed in luciferase reporter system. The different 120 bp duplication alleles (1-repeat, 2-repeat and the newly identified 4-repeat allele) was found to have an effect on transcriptional activity of the DRD4 gene in both neuroblastoma and retinoblastoma cell lines in a dose-dependent manner. The higher was the repeat number of the 120 bp sequence in the promoter, the stronger

was the decrease of the gene transcription (1-repeat > 2-repeat > 4-repeat; $p < 0.01$).

These results of association and functional analyses suggest that the 1-repeat form of the 120 bp duplication might be a risk factor of ADHD.

KEYWORDS: dopamine D4 receptor (DRD4), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), polymorphism, association-analysis

Bevezetés

A figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD) az egyik leggyakoribb gyermekkori pszichés zavar, mely az iskoláskorú gyermekek 3-5%-át érinti (Swanson és mtsai, 1998). Jellemző tünetei közé tartozik a hiperaktivitás, a figyelemhiány és az impulzivitás. Az ADHD-ban végzett család-, iker-, és örökbefogadásos vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a rendellenesség becsült örökölhetősége 0,7–0,8 közötti, mely jelentős genetikai háttérre utal (Faraone és Biederman, 1998). A genetikai asszociáció vizsgálatok számos kis hatású gént azonosítottak ADHD-val kapcsolatban (Comings és mtsai, 2005). Neurobiológiai modellek alapján a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar kandidáns génjei elsősorban a dopamin rendszer tagjai (receptorok, transzporterek, szintetizáló és lebontó enzimek) közül kerülnek ki. Az utóbbi időben ennek megfelelően nagy figyelem irányul az erősen polimorf dopamin D4-es receptor génjére (DRD4).

A DRD4 gén legszélesebb körben vizsgált polimorfizmusa a III. exonban található 48 bp VNTR (Variable Number of Tandem Repeats, hosszúság-polimorfizmus). Egy meta-analízis, mely a szakirodalomban eddig megjelent eset-kontroll és család alapú vizsgálatokat együttesen dolgozta fel, egyértelmű összefüggést talált a VNTR és az ADHD között (Faraone és mtsai, 2005). Emellett egyre több, az 5' szabályozó régió polimorfizmusait vizsgáló tanulmány jelenik meg. Család-vizsgálatok során McCracken és munkatársai (2000) a DRD4 gén promoterében lévő 120 bp duplikáció kétszeres ismétlődési variánsának preferenciális allél-átadását figyelték meg ADHD-s gyermekeknél. A vizsgálatot később egy nagyobb mintaszámon megismételve hasonló eredményt kaptak (Kustanovich és mtsai, 2004). Egy másik munkacsoport ikreket vizsgálva azonban nem talált

asszociációt az ADHD és a 120 bp duplikáció között (Todd és mtsai, 2001). Ezen kívül érdekes adat, hogy összefüggést mutattak ki az egyszeres ismétlődési változat és az újdonságkereső magatartás között, amely személyiségjegyek közös vonásokat mutat az ADHD bizonyos jellemzőivel (Rogers és mtsai, 2004).

A DRD4 promoter régiójában található számos egyponos nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) közül a –616 C/G és a –521 C/T változatok asszociációját vizsgálták ADHD-val (Barr és mtsai, 2001; Mill és mtsai, 2003; Lowe és mtsai, 2004; Bellgrove és mtsai, 2005). A polimorfizmusokat külön-külön elemezve egyetlen tanulmány tudott szignifikáns összefüggést kimutatni a figyelemzavar és a –616 C/G SNP között ír populációban, ez a –521 C/T esetén már csak tendencia szintűnek adódott (Lowe és mtsai, 2004). A –521 C/T SNP-t az újdonságkereső személyiségjeggyel összefüggésben is vizsgálták. Asszociációt találtak ezen jelleg és a –521 CC genotípus között egy japán populációban (Okuyama és mtsai, 2000). Ezt az eredményt később kaukázusi mintán sikeresen megismételték (Ronai és mtsai, 2001), bár negatív eredmények szintén ismertek (Ekelund és mtsai, 2001; Strobel és mtsai, 2002). Egy számos tanulmányt összefoglaló meta-analízis azonban gyenge, de pozitív asszociációt mutatott ki az újdonságkeresés és a –521 C/T SNP között (Schinka és mtsai, 2002).

A humán genom polimorfizmusainak feltérképezése jóval nagyobb ütemben zajlik, mint azok funkcionális vizsgálata, emiatt a pszichogenetikai vizsgálatok során is egyre több, még csak marker-jellegű polimorfizmust vizsgálnak. Azonban továbbra is sokkal nagyobb információ-tartalmú a feltehetően funkcionális hatással rendelkező génvariánsok vizsgálata. A DRD4 gén III. exonjában található 48 bp VNTR 16 aminosav ismétlődését okozza a receptor jelátvitelben fontos, citoplazmában elhelyezkedő részében (Asghari és mtsai

1995). A DRD4 gén 5' szabályozó régiójának karakterizálása lehetőséget adott a gén promoter polimorfizmusainak funkcionális vizsgálatára (Kamakura és mtsai, 1997). Egy japán munkacsoport szerint a -521. pozíció polimorfizmusának T allélja 40%-kal kisebb transzkripció aktivitással jellemezhető a C változathoz képest *in vitro*, tranziensen transzfektált retinoblastóma Y79 sejtvonalban (Okuyama és mtsai 1999, 2000), bár ennek ellentmondó adat is ismert (Kereszturi és mtsai, 2006). Egy másik polimorfizmus, a 120 bp duplikáció szekvenciájában számos transzkripció faktor kötőhelyet azonosítottak *in silico* kereséssel (Seaman és mtsai, 1999), mely azt feltételezi, hogy ez a régió hatással lehet a promoter aktivitására. Egy funkcionális vizsgálat szerint a 120 bp duplikáció 1-szeres ismétlődésű allélja nagyobb transzkripció aktivitást mutatott a duplikált formához képest (D'Souza és mtsai, 2004).

Munkánk során a DRD4 gén promoterében lévő polimorfizmusok szerepét vizsgáltuk a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar hátterében mind asszociáció vizsgálattal, mind pedig funkcionális analízis segítségével.

Módszerek

A vizsgálatban résztvevő személyek

Az általunk vizsgált beteg populációt a Vadas kert Gyermekpszichiátriai Kórház és Szakambulancián ADHD-val diagnosztizált gyermekek alkották. A diagnózis felállítása a DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) szerint történt (American Psychiatric Association, 1994). A betegek átlag életkora $9,1 \pm 2,6$ év. Az alacsony IQ pontszámmal (IQ < 80), valamint egyéb neurológiai vagy pervazív pszichiátriai zavarokkal rendelkező gyermekeket kizártuk a vizsgálatból. DNS-mintát a gyermekektől és a szüleiktől egyaránt gyűjtöttünk, a vizsgálat menetének ismeretéről a szülők írásos beleegyezést adtak. A vizsgálatban 173 gyermek vett részt. Az ETT-TUKEB a vizsgálatokhoz etikai engedélyt adott.

A nemből illesztett kontroll csoportot a korábban leírt 604 fős magyar populációból választottuk (Szantai és mtsai, 2005); 284 személy genetikai adatait használtuk fel a statisztikai elemzéshez. Mind a klinikai, mind a kontroll csoport etnikailag homogén volt, kaukázusi eredetű, egymással nem rokon mintákból állt.

Genotípus-meghatározás

A DNS-mintavétel a laboratóriumunkban kidolgozott nem-invazív módon, szájnyalvákahártya sejtekből történt (Boor és mtsai, 2002). A DRD4 gén hosszúság-polimorfizmusának vizsgálata során az ismétlődések számát polimeráz láncreakcióval határoztuk meg. Az egy pontos nukleotid polimorfizmusokat (-616 C/G, -521 C/T SNP) minden egyes mintában két, egymástól független módszerrel (PCR-RFLP és kétirányú allél-specifikus amplifikáció) határoztuk meg (Szantai és mtsai, 2005).

Plazmid konstruktumok

A pGL3 luciferáz riporter rendszert (Promega) használtuk a DRD4 gén promoterének -1571. és -389. pozíciók közötti, a 120 bp duplikációt is hordozó szakaszának vizsgálatához. Ezt a szakaszt *Xho*I és *Hind*III restrikciós hasító helyet tartalmazó primerpárral felszorzoztunk (forward/DR4-S1: 5' acc act cga gtg ggc tgg act cgc cgt ttg gc 3'; reverse/DR4-AS1: 5' aag gaa gct tcc ctc ggg cgc tca ccc tag tcc 3'), majd a pGL3-Basic promoter nélküli riporter vektorba klónoztuk. A 120 bp duplikáció 1-szeres, 2-szeres és 4-szeres változatát hordozó vektorokat a megfelelő allélt hordozó személy genomialis mintáját felhasználva készítettük el. A plazmid konstruktumokat direkt szekvenálással ellenőriztük.

Sejtvonalak

A HeLa sejteket 10% magzati marhaszérummal (Fetal Bovine Serum, FBS), 1% nem esszenciális aminosavakkal és 1% Na-piruváttal kiegészített MEM (minimal essential medium Eagle) médiumban tenyésztettük. A humán eredetű Y79 retinoblastóma sejtvonalat 20% FBS-sel, 1% nem esszenciális aminosavakkal és 1% Na-piruváttal kiegészített RPMI 1640 médiumban tartottuk fenn. Az SK-N-FI neuroblastóma sejteket D-MEM-ben (Dulbeco's modified Eagle's Medium) tenyésztettük, amit 10% FBS-sel egészítettünk ki. Minden sejtvonalat 37°C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett növesztettük.

Tranziens transzfekció

Az SK-N-FI és az Y79 sejtvonalak esetén $1,5 \times 10^6$, HeLa-ból kb. $0,5 \times 10^6$ sejtet szélesztettük ki 6, illetve 12 osztatú lemezre 24 órával a kísérlet előtt. Az SK-N-FI és HeLa sejtvonalak tranziens transzfekcióját Lipofectamin 2000 reagenssel (Invitrogen), az Y79 sejteket Lipofectamin és Plus reagens (Invitrogen) keverékével végeztük a gyártó protokollja alapján. A riporter plazmidokból 1–5 µg-ot, a kontroll-

ként használt pCMV- β -gal vektorból 0,2-2,5 μ g-ot juttattunk a sejtekbe. A transzfecció után 5 órával 1-1,2 ml friss médiumot adtunk a sejt kultúrákhoz, majd a begyűjtésig további 48 óráig inkubáltuk.

A transzfecciótált sejteket 100 μ l 250 mM Tris-HCl-ban (pH=8,0) vettük fel. A sejteltávolítást három egymást követő fagyasztás-olvasztás ciklussal végeztük. Az enzimaktivitás mérése a felülszóból történt. A luciferáz enzimaktivitását a Luciferase Assay System kit (Promega) segítségével, a β -galaktozidáz enzimaktivitását az OMPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) hasítási rátája alapján határoztuk meg. A promoterekre jellemző luciferáz aktivitásokat a transzfecciók kontrollként használt β -galaktozidáz aktivitásokkal normalizáltuk. Minden kísérleti pontot három ismétlésben végeztünk.

Statisztikai módszerek

A genetikai asszociáció-vizsgálatoknál az SPSS 10.0 statisztikai programcsomagot használtuk. A transzfecciók kísérletek kiértékelése során egyutas ANOVÁ-t használtunk, melyet a Tukey-Kramer féle páronkénti összehasonlítási teszt követte.

Eredmények

A 120 bp duplikáció új alléljának azonosítása

Munkánk során a 120 bp duplikáció egy új allélját azonosítottuk. Egy ADHD-s gyermek mintájának vizsgálatakor rendellenes méretű fragmentumot kaptunk a gélelektroforetikus képen. Ez a PCR-termék jóval hosszabb volt, mint az 1-szeres (428 bp) és 2-szeres (548 bp) változat (1. ábra).

A rendellenes PCR-terméket megszekvenáltattuk. A szekvencia analízise során kiderült, hogy a DRD4 gén promoterében a 120 bázispáros szakasz négyszeri ismétlődéséről van szó. Az ismétlődési egységek tandem helyezkednek el egymáshoz képest és szekvenciájuk pontosan megegyezik. A genotípus tisztázása érdekében a gyermek szüleitől is mintát vettünk és az apánál szintén azonosítottuk ezt az új allélt (1B. ábra, 2. minta). A 4-es allél az általunk vizsgált kontroll csoportban egyáltalán nem fordult elő, az ADHD-s populációban is mindössze egynél azonosítottuk.

A DRD4 gén promoter polimorfizmusainak asszociáció-vizsgálata ADHD-ban

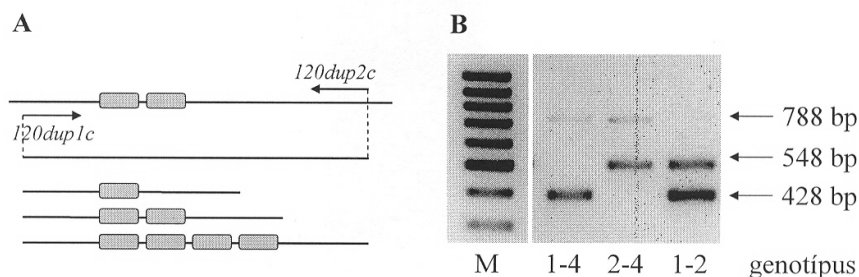
Összehasonlítottuk az ADHD-s és a kontroll populáció allél- és genotípus-gyakoriságait a DRD4 gén promoter polimorfizmusaira. Az allél-frekvenciák az 1. táblázatban láthatók. A kontroll populáció allél-gyakoriságai hasonlóak voltak egyéb kaukázusi populációk adataihoz mind a 120 bp duplikáció, mind pedig a három SNP esetén. A vizsgált SNP-k közül egyik sem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a két populációban. A 120 bp duplikáció allél-gyakoriságai azonban szignifikáns mértékben különböztek az eset és a kontroll csoportban ($\chi^2=3,928$; $df=1$; $p=0,047$). A 120 bp hosszúság-polimorfizmus általunk azonosított 4-szeres ismétlődési változata nem szerepelt a statisztikai elemzésben, hiszen nagyon ritka (az ADHD-s populációban mindössze egy gyermek mintájában tudtuk kimutatni heterozigóta formában).

Az eset és a kontroll populáció DRD4 promoter genotípus-gyakoriságait a 2. táblázat mutatja. Ahogyan az allél-eloszlás vizsgálatánál, úgy a genotípusok tekintetében is egyedül a 120 bp dupli-

1. ábra. A 120 bp duplikáció 4-es allélja egy ADHD-s családi trióban

A: A PCR-alapú genotipizáló módszer elvi vázlata. A nyilak jelölik a használt primereket, a szürke téglalapok pedig a 120 bp dup lehetséges ismétlődési számát.

B: Az új allél elektroforetikus képe. M: 100 bp-os létra, majd az ADHD-s gyermek, az apa és az anya mintája.



1. táblázat. A DRD4 gén promoter polimorfizmusainak allél-gyakoriságai kontroll és ADHD-s populációban

Polimorfizmus	120 bp dup			-616 C/G SNP		-615 A/G SNP		-521 C/T SNP	
	1	2	4	C	G	A	G	C	T
Allél									
Kontroll (2N=568) gyakoriság (%)	91 16,0	477 84,0	0* 0,0	293 51,6	275 48,5	498 87,7	70 12,3	319 56,2	249 43,8
ADHD (2N=346) gyakoriság (%)	74 21,4	271 78,3	1* 0,3	172 49,7	174 50,3	291 84,1	55 15,9	146 42,2	200 57,8
χ^2	3,928			0,302		2,324		0,236	
p (df=1)	0,047			0,583		0,127		0,627	

A vastagbetűvel jelölt számok a számított gyakoriságtételeket, a normál betűs számok a ténylegesen mért adatokat mutatják. *A statisztikai értékelésnél nem vettük figyelembe azokat a kategóriákat, ahol a várható érték <5.

káció esetén találtunk eltérést a vizsgált populációk között ($\chi^2=5,713$; df=2; p=0,057).

A 120 bp duplikáció genotípus-frekvencia értékei azt mutatják, hogy az 1-1 változat az ADHD-sok körében több mint kétszer gyakoribb, mint a kontroll populációban (8,1% vs 3,2%, 2. táblázat). Ennek megfelelően a szakirodalomban jól ismert és elfogadott összevonást alkalmaztuk: a DRD4 promoter 120 bp duplikáció 2-es allélját hatásában dominánsnak tételeztük fel az 1-es felett, ezért az 1-2 és a 2-2 genotípus-kategóriák összevonhatók. A χ^2 -próbat elvégezve azt találtuk, hogy szignifikáns eltérés mutatható ki az ADHD-s és a kontroll csoportok összevont genotípus-eloszlásában ($\chi^2=5,456$; df=1; p=0,019), mely eredmény jól egyezik az allél-gyakoriságok összehasonlításánál kapott adatokkal. Az 1-1 genotípusra számolt esélyhányados értéke (odds ratio, OR) 2,71, azaz az 1-1

genotípus megléte egy adott személy genomjában 2,71-szer nagyobb rizikót jelent az ADHD kialakulására, mint a polimorfizmus bármely más genotípusa.

A 120 bp duplikáció funkcionális vizsgálata

A 120 bp duplikáció hatásának további vizsgálatára három különböző plazmid konstruktumot hoztunk létre. A 120 bp dup 1-szeres, 2-szeres és az általunk leírt 4-szeres változatát pGL3-Basic reporter plazmidba klónoztuk, melyek -616 C, -615 A és -521 C háttérrel készültek.

A 120 bp szekvencia egyszeres kópiáját tartalmazó DRD4 szabályozó régió szignifikánsan nagyobb luciferáz aktivitást váltott ki az Y79 (p<0,01), SK-N-FI (P<0,001) és HeLa (p<0,05) sejtvonalakban, mint a kétszeres változatot hordozó konstruktumok (2. ábra). Szignifikáns különbsé-

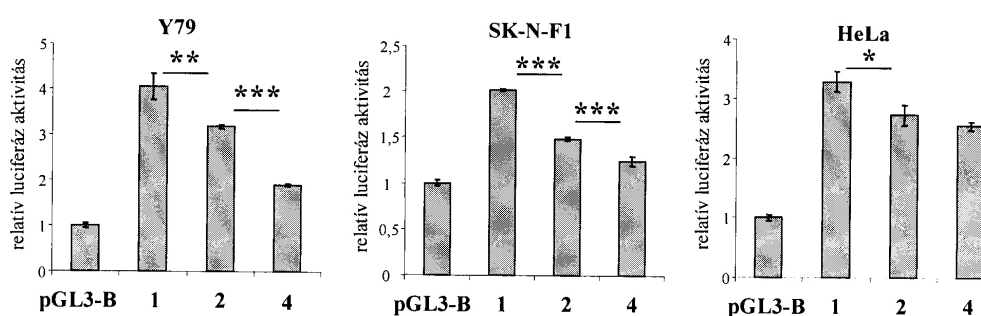
2. táblázat.

A DRD4 gén promoter polimorfizmusainak genotípus-gyakoriságai kontroll és ADHD-s populációban

Polimorfizmus	Genotípus	Kontroll		ADHD		χ^2	p (df=2)
		N=284	Fr (%)	N=173	Fr (%)		
120 bp dup	1-1	9	3,2	14	8,1	5,713	0,057
	1-2	73	25,7	45	26,0		
	1-4	0*	0,0	1*	0,6		
	2-2	202	71,1	113	65,3		
-616 C/G SNP	CC	81	28,5	43	24,9	0,824	0,662
	CG	131	46,1	86	49,7		
	GG	72	25,4	44	25,4		
-615 C/G SNP	AA	218	76,8	121	69,9	2,614	0,271
	AG	62	21,8	49	28,3		
	GG	4*	1,4	3*	1,7		
-521 C/T SNP	CC	55	19,4	27	15,6	2,164	0,539
	CT	139	48,9	92	53,2		
	TT	90	31,7	54	31,2		

A vastagbetűvel jelölt számok a számított gyakoriságtételeket (Fr%), a normál betűs számok a ténylegesen mért adatokat mutatják. *A statisztikai értékelésnél nem vettük figyelembe azokat a kategóriákat, ahol a várható érték <5.

2. ábra. A 120 bp duplikáció hatása a DRD4 gén expressziójára



A pDRD4-A konstrukciók relatív luciferáz aktivitása a pGL3-B kontroll vektor aktivitásának függvényében látható. A diagram egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja, az 1, 2, 4 a 120 bp dup előfordulási számát jelenti a promoterben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

get találtunk továbbá a 2-szeres és 4-szeres változat transzkripcióra gyakorolt hatása között is. A 120 bp-nyi szakaszt négyszer tartalmazó promoter régió mutatta a legalacsonyabb aktivitást az SK-N-FI és az Y79 ($p < 0,001$) sejtekben. Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a 120 bp-nyi szakasz a DRD4 promoterben represszor hatású, és a hatása dózis-függő módon nyilvánul meg; minél nagyobb az ismétlődési szám, annál jobban csökken a promoter aktivitása (1-szeres > 2-szeres > 4-szeres ismétlődés).

Diszkusszió

Munkánk során az eset-kontroll megközelítést alkalmazva nem találtunk összefüggést sem az allélgyakoriság, sem a genotípus-frekvencia esetén a vizsgált DRD4 gén promoter SNP-k és az ADHD között. A 120 bp duplikáció 1-szeres, rövid változata azonban szignifikánsan gyakoribb volt a beteg csoportban, mind allél-, mind pedig genotípus-gyakoriság tekintetében. A 120 bp duplikációról szóló irodalmi adatok ADHD tekintetében ellentmondásosak. Néhány munka a 2-szeres ismétlődési formát tartja a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar rizikófaktorának (McCracken és mtsai, 2000; Kustanovich és mtsai, 2004), míg mások ezt nem erősítik meg (Barr és mtsai, 2001; Todd és mtsai, 2001; Mill és mtsai, 2003; Brookes és mtsai, 2005). Eredményeink alapján mi azt feltételezzük, hogy a 120 bp duplikáció rövid formája az ADHD egy lehetséges genetikai rizikófaktora. Ezt az elképzelést támasztja alá a 120 bp duplikáció 1-szeres változata és az újdonságkereső személyiségjegyek közötti pozitív asszociáció is, ugyanis az újdonságkeresés személyiségjegye és az ADHD bizonyos tünetei között közös jellemzők fordulnak elő (Rogers és mtsai, 2004).

A 120 bp duplikáció transzkripcióra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk *in vitro* luciferáz riporter rendszerben. Az asszociáció-analízis során az ADHD-s populációban újonnan detektált 4-szeres változatot szintén bevontuk a funkcionális vizsgálatba. A tranziens transzfekciós kísérletekben a 120 bp duplikáció növekvő számú ismétlődő egysége csökkenő transzkripció aktivitást eredményezett a DRD4 promoterén keresztül mind a három vizsgált sejtvonalban, ami alátámasztja egy korábbi tanulmány eredményeit (D'Souza és mtsai 2004). A két vizsgálati rendszer között azonban számos különbség van. Az angol munkacsoport kizárólag a 120 bp duplikáció szekvenciáját klónoztatta a pGL3-Basic promoter nélküli riporter plazmidba, feltételezve, hogy e szekvenciának önmagában is van promoter aktivitása. Publikációjuk alapján megpróbáltuk reprodukálni az eredményeiket, de a mi rendszerünkben az általuk használt vektoroknak nem volt transzkripció aktivitásuk, azaz még a pGL3-Basic szintjét sem érték el. Ezzel szemben az általunk alkalmazott -1571 és -389 pozíció közötti fragmentum bizonyítottan a DRD4 funkcionális promotere (Kereszturi és mtsai, 2006), így alkalmasnak bizonyult a 120 bp duplikáció vizsgálatára. A 120 bp funkcionális hatását alátámasztja az is, hogy számos transzkripció faktor kötőhely konszenzus szekvenciáját azonosították a polimorfizmus területén *in silico*, mint például a MEP-1, CEB/P és Sp1 faktorokét (Seaman és mtsai, 1999). Ezen kívül a 2-szeres változat erősebb Sp1 kötő-képességét is bizonyították elektroforetikus mobilitásváltozási vizsgálatokkal (Ronai és mtsai, 2004).

A szakirodalom elsősorban a 120 bp duplikált formáját hozza összefüggésbe a figyelemhiányos hiperaktivitási zavarral (McCracken és mtsai, 2000), saját eredményeink ennek látszólag ellentmondanak, hiszen egy betegség hátterében nem

szerepelhet egyszerre a nagyobb és a kisebb aktivitású allél is. Az ADHD tüneteinek megjelenésében sokáig szinte kizárólag a dopamin rendszer zavarának hatásait feltételezték. Ma azonban azt valószínűsítik, hogy a betegség manifesztációjában a többi agyi monoamin rendszer diszfunkciója, egyensúlyzavara is szerepet játszhat. Ez azt jelentheti, hogy a dopamin rendszerhez kötődő jelátvitel a többi rendszerhez (szerotonin, noradrenalin) viszonyított aránya a meghatározó. Az egyik ilyen elmélet szerint például az ADHD kialakulásában a dopamin rendszer noradrenalinhoz viszonyított túlzott, de a szerotoninhez képest csökkent működése áll (Oades, 2002). Ezen kívül ismert, hogy a dopamin túl alacsony és túl magas szintje egyaránt neuropszichológiai zavarokat eredményezhet (Arnsten és Li, 2005). Így nem kizárt, hogy bizonyos esetekben a 120 bp duplikáció kisebb és nagyobb aktivitású allélja is összefügghet a figyelemhiányos hiperaktivitási zavarral.

Nem elég tehát kizárólag a dopamin rendszer állapotát vizsgálni, az agyi neurotranszmisszió többi elemének egyidejű tanulmányozására is szükség lenne, mert ezen rendszerek és folyamatok egymáshoz viszonyított aránya tűnik meghatározónak egy-egy kórkép kialakulásában.

Köszönetnyilvánítás

Az ADHD genetikájával kapcsolatos kutatásainkat az NKFP 1A/0008/2002 pályázat támogatásával kezdtük el. A molekuláris biológiai részt az OTKA T048576 és D048430 pályázatok támogatásával végeztük.

Levelezési cím:

Kereszturi Éva

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani,
Molekuláris Biológia és Pathobiokémiai Intézet
1088 Bp Puskin u. 9.

Tel: (06 1) 266 2755/4028

e-mail: keva@puskin.sote.hu

IRODALOM

- American Psychiatric Association. Attention-deficit and disruptive behavior disorders, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV. American Psychiatric Association. Washington. DC. 1994 pp.78-85.
- Arnsten AF, Li BM. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 2005; 57 (11): 1377-84.
- Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem*. 1995;65(3):1157-65.
- Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B*. 2001; 105 (1): 84-90.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. DRD4 gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of associated alleles at the VNTR and -521 SNP. *Am J Med Genet B*. 2005;136(1):81-6.
- Boor K, Ronai Z, Nemoda Z, Gaszner P, Sasvari-Szekely M, Guttman A, Kalasz H. Noninvasive genotyping of dopamine receptor D4 (DRD4) using nanograms of DNA from substance-dependent patients. *Curr Med Chem*. 2002; 9 (8):793-7.
- Brookes KJ, Xu X, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. No evidence for the association of DRD4 with ADHD in a Taiwanese population within-family study. *BMC Med Genet*. 2005; 6:31.
- Comings DE, Chen TJ, Blum K, Mengucci JF, Blum SH, Meshkin B. Neurogenetic interactions and aberrant behavioral co-morbidity of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): dispelling myths. *Theor Biol Med Model*. 2005; 2:50.
- D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ, Craig IW. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the DRD4 gene. *Biol Psychiatry* 2004; 56 (9):691-7.
- Ekelund J, Suhonen J, Jarvelin MR, Peltonen L, Lichtermann D. No association of the -521 C/T polymorphism in the promoter of DRD4 with novelty seeking. *Mol Psychiatry*. 2001; 6 (6): 618-9.
- Faraone SV, Biederman J. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 1998; 44 (10): 951-8.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005; 57 (11): 1313-23.
- Kamakura S, Iwaki A, Matsumoto M, Fukumaki Y. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine D4 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 235 (2):321-6.
- Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z. No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *BMC Mol Biol*. 2006; 7: 18.
- Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Mol Psychiatry*. 2004; 9 (7): 711-7.
- Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Multiple marker analysis at the promoter region of the DRD4 gene and ADHD: evidence of linkage and association with the SNP -616. *Am J Med Genet B Neuro-psychiatr Genet*. 2004;131(1):33-7.
- McCracken JT, Smalley SL, McGough JJ, Crawford L, Del'Homme M, Cantor RM, Liu A, Nelson SF. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry*. 2000; 5 (5): 531-6.

- Mill J, Fisher N, Curran S, Richards S, Taylor E, Asherson P. Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuroreport*. 2003;14(11):1463-6.
- Oades RD. Dopamine may be 'hyper' with respect to noradrenaline metabolism, but 'hypo' with respect to serotonin metabolism in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*. 2002; 130 (1-2): 97-102.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Nankai M, Shibuya H, Watanabe A, Arinami T. Identification of a polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with the human novelty seeking personality trait. *Mol Psychiatry*. 2000; 5 (1):64-9.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M, Arinami T. A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 258 (2):292-5.
- Rogers G, Joyce P, Mulder R, Sellman D, Miller A, Allington M, Olds R, Wells E, Kennedy M. Association of a duplicated repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of the DRD4 gene with novelty seeking. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004; 126 (1):95-8.
- Ronai Z, Guttman A, Keszler G, Sasvari-Szekely M. Capillary electrophoresis study on DNA-protein complex formation in the polymorphic 5' upstream region of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *Curr Med Chem*. 2004; 11 (8):1023-9.
- Ronai Z, Szekely A, Nemoda Z, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. Association between Novelty Seeking and the -521 C/T polymorphism in the promoter region of the DRD4 gene. *Mol Psychiatry*. 2001; 6 (1):35-8.
- Schinka JA, Letsch EA, Crawford FC. DRD4 and novelty seeking: results of meta-analyses. *Am J Med Genet*. 2002; 114 (6):643-8.
- Seaman MI, Fisher JB, Chang FM, Kidd KK. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). *Am J Med Genet*. 1999; 88 (6):705-9.
- Strobel A, Lesch KP, Hohenberger K, Jatzke S, Gutzzeit HO, Anacker K, Brocke B. No association between dopamine D4 receptor gene exon III and -521C/T polymorphism and novelty seeking. *Mol Psychiatry*. 2002; 7 (6): 537-8.
- Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJ, Jensen PS, Cantwell DP. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet*. 1998. 351 (9100): 429-433.
- Szantai E, Kiraly O, Nemoda Z, Kereszturi E, Csapo Z, Sasvari-Szekely M, Gervai J, Ronai Z. Linkage analysis and molecular haplotyping of the dopamine D4 receptor gene promoter region. *Psychiatr Genet*. 2005; 15 (4): 259-70.
- Todd RD, Neuman RJ, Lobos EA, Jong YJ, Reich W, Heath AC. Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet*. 2001; 105 (5): 432-8.