

ISMÉTLŐDÉSI POLIMORFIZMUSOK A KUTYA DOPAMINERG GÉNJEIBEN

Doktori értekezés

Héjjas Krisztina

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola
Vezető: **Prof Erdei Anna**

Szerkezeti Biokémia Doktori Program
Vezető: **Prof Gráf László**



Témavezető: **Dr. Rónai Zsolt PhD**, egyetemi adjunktus

Kutatóhely: Semmelweis Egyetem
Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

Budapest

2008

TARTALOMJEGYZÉK

Táblázatjegyzék	IV
Ábrajegyzék.....	V
Rövidítésjegyzék	VI
1 Bevezetés	1
2 Irodalmi áttekintés	3
2.1 Humán genom variációi	3
2.2 A dopaminerg pályarendszer.....	4
2.3 Dopamin D4-es receptor (<i>DRD4</i>)	6
2.3.1 Humán <i>DRD4</i> gén polimorfizmusai.....	7
2.3.1.1 Polimorfizmusok az exonokban.....	7
2.3.1.2 Polimorfizmusok az 5' szabályozó régióban.....	7
2.3.2 Kutya <i>DRD4</i> gén polimorfizmusai.....	8
2.4 Tirozin-hidroxiláz (<i>TH</i>).....	10
2.4.1 Humán <i>TH</i> gén polimorfizmusai.....	10
2.4.2 Kutya <i>TH</i> gén polimorfizmusai.....	11
2.5 Dopamin- β -hidroxiláz (<i>DBH</i>)	11
2.5.1 Humán <i>DBH</i> gén polimorfizmusai.....	11
2.5.2 Kutya <i>DBH</i> gén polimorfizmusai.....	12
2.6 Dopamin-transzporter (<i>DAT</i>)	12
2.6.1 Humán <i>DAT</i> gén polimorfizmusai.....	12
2.6.2 Kutya <i>DAT</i> gén polimorfizmusai.....	13
2.7 A kutya, mint modell állat.....	13
2.7.1 Miért pont a kutya?.....	13
2.7.1.1 Domesztikáció.....	13
2.7.1.2 A kutya szerepe a humán viselkedési vizsgálatokban.....	14
2.7.1.3 A kutya mint a humán pszichogenetikai vizsgálatok egyik lehetséges modell állata.....	14
2.7.1.4 Állatmodellek a hiperaktivitás genetikai hátterének vizsgálatában	15
2.8 Kandidáns gének asszociáció vizsgálata	15
2.8.1 A humán dopaminerg rendszer génjeinek asszociáció vizsgálatai.....	16
2.8.2 A kutya dopaminerg rendszer génjeinek asszociáció vizsgálatai.....	18
2.9 Nem-kódoló polimorfizmusok funkcionális vizsgálata	19
2.10 Gén kópiaszám polimorfizmus.....	21
3 Célkitűzések.....	22
4 Módszerek.....	23
4.1 A vizsgálatban résztvevő állatok.....	23
4.2 Mintavétel és DNS izolálás	23
4.3 Genotípus meghatározás	24
4.3.1 In silico analízis	24
4.3.2 Amplifikáció körülményei.....	24
4.3.2.1 A PCR-elegy összetétele	24
4.3.2.2 A PCR-termociklus	25
4.3.3 PCR-termékek elektroforetikus elválasztása.....	25
4.3.4 qPCR.....	26

4.4	Tranziens transzfekeció.....	27
4.4.1	Luciferáz riporter rendszer	28
4.4.2	Transzfekeciók kontroll	28
4.4.3	Plazmid konstruktumok	28
4.4.4	Sejtvonalak	30
4.4.5	Transzfekeciók módszerek.....	30
4.4.5.1	Transzfekeciók módszerek	30
4.4.5.2	Luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése	31
4.5	Fenotípus felvétele	31
4.6	Statisztikai módszerek.....	32
5	Eredmények	33
5.1	A DRD4 3. exon VNTR és az aktivitás-impulzivitás mértékének összefüggése német juhászok csoportjában	33
5.1.1	A DRD4 3. exon VNTR allél- és genotípus megoszlása német juhászok csoportjában	33
5.1.2	A DRD4 VNTR és a kutyára adaptált ADHD kérdőív aktivitás-impulzivitás skálaértékeinek összefüggése.....	35
5.2	A D4-es dopamin receptorban levő ismert VNTR-ek analízise.....	36
5.3	A DRD4 gén 2. intron VNTR vizsgálata	38
5.3.1	Új ismétlődési polimorfizmus kimutatása a DRD4 2. intronban.....	38
5.3.2	A DRD4 gén 2. intron polimorfizmus funkcionális vizsgálata	40
5.3.2.1	A DRD4 2. intron VNTR funkcionális vizsgálata tranziens transzfekecióval két sejtvonalon	41
5.4	Ismétlődési polimorfizmusok keresése	43
5.4.1	VNTR-ek in silico keresése további kutya dopaminerg génekben.....	43
5.4.2	Új VNTR-ek vizsgálata	44
5.5	Gén kópiaszám polimorfizmus keresése	46
5.5.1	Esetleges CNV-k felkutatása a kutya dopaminerg és szerotonerg génjeiben qPCR módszerrel	46
6	Eredmények megbeszélése	51
6.1	A DRD4 gén 3. exon VNTR polimorfizmus és viselkedésbeli asszociációja.....	51
6.2	DRD4 2. intron VNTR analízise	52
6.3	További ismétlődési polimorfizmusok kiterjedt populáció vizsgálata a kutya dopaminerg rendszer génjeiben	55
6.4	Gén kópiaszám polimorfizmusok vizsgálata a kutya dopaminerg és szerotonerg génjeiben.....	57
7	Összefoglalás	60
8	Summary	61
9	Melléklet	62
10	Köszönetnyilvánítás	63
11	Saját közlemények	64
12	Irodalomjegyzék	65

TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat: Az ismétlődési polimorfizmusok azonosításához használt primerek legfontosabb jellemzői.	26
2. táblázat: A copy number polimorfizmusok genotipizálásához használt oligók fontosabb jellemzői.	27
3. táblázat: A konstruktumok elkészítéséhez használt primerek.	29
4. táblázat: Az általunk használt sejtvonalak jellemzői és a fenntartásukhoz használt médiumok összetétele.	30
5. táblázat: A DRD4 gén 3. exon VNTR allél és genotípus megoszlása a viselkedés genetikai asszociáció analízisbe bevont német juhászkutya populációban.....	35
6. táblázat: A DRD4 2. intron VNTR allél és genotípus megoszlása (%) a különböző kutyafajtákban és a farkasban.	38
7. táblázat: DRD4 gén 1. és 3. exon genotípusainak megoszlása (%) a különböző vizsgált kutyafajtákban és a farkasban.....	40
8. táblázat: TH, DBH és DAT génekben levő polimorfizmusok genotípus frekvencia értékei (%) a vizsgált kutyafajtákban és a farkasban.	45
9. táblázat: A génszám változások meghatározásához általunk tervezett próbák fontosabb jellemzői.	48
10. táblázat: CNV analízis egy példája.....	49
11. táblázat: Ismétlődő szekvenciák és polimorfizmusaik az ember és kutya dopaminerg rendszer génjeiben.....	56

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: Monoaminerg pályarendszerek anatómiai lokalizációja.	5
2. ábra: A dopamin metabolizmusa.	6
3. ábra: A DRD4 3. exonban levő ismétlődő egységek.	9
4. ábra: A dopamin D4-es receptor gén polimorfizmusai.	9
5. ábra: A DRD4 2. intron variációk funkcionális vizsgálatához használt konstruktumok.	30
6. ábra: DRD4 3. exon VNTR szerkezete és elektroforetikus képe.	34
7. ábra: Aktivitás-impulzivitás átlagértékek a családi és rendőr német juhászkutyák különböző genotípusú csoportjaiban.	36
8. ábra: A kutya DRD4 2. intron VNTR szerkezete.	37
9. ábra: A DRD4 2. intron VNTR PCR alapú vizsgálata.	39
10. ábra: A 2. intron hatása a DRD4 gén expressziójára.	39
11. ábra: A dopamin D4-es receptorban előforduló VNTR-ek vizsgálata.	42
12. ábra: Új ismétlődési polimorfizmusok genotipizálása.	44
13. ábra: Hígítási sorozat.	47
14. ábra: Elméleti hígítási sorozat.	58

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

(TCAT) _n	a (timin-citozin-adenin-timin) 5-11 ismétlődésével kialakuló polimorfizmus
48 bp VNTR	a humán DRD4 gén III. exonjában elhelyezkedő 48 bp hosszú szekvencia, amely 2-10-szer ismétlődhet
-521 C/T SNP	A humán DRD4 gén promóter régiójában a -521. pozícióban citozin → timin csere
-615 A/G SNP	A humán DRD4 gén promóter régiójában a -615. pozícióban adenin → guanin csere
-616 C/G SNP	A humán DRD4 gén promóter régiójában a -616. pozícióban citozin → guanin csere
97C/T SNP	A kutya TH gén kódoló régiójában a 97. pozícióban kétféle nukleotid fordulhat elő (C vagy T)
264C/T SNP	A kutya TH gén kódoló régiójában a 264. pozícióban kétféle nukleotid fordulhat elő (C vagy T)
168A/G SNP	A kutya TH gén kódoló régiójában a 168. pozícióban kétféle nukleotid fordulhat elő (A vagy G)
180A/G SNP	A kutya TH gén kódoló régiójában a 180. pozícióban kétféle nukleotid fordulhat elő (A vagy G)
arg535cys	A humán DBH gén 11. exonjában az 535. pozícióban arginin → cisztein módosulás
168A allél	A kutya TH gén 168-as helyen A van
264T allél	A kutya TH gén 264-es helyen T van
2 allél	A kutya DRD4 3. exon VNTR 2-es allélja
3a allél	A kutya DRD4 3. exon VNTR 3a allélja
A	adenin
A7 allél	A humán DAT gén 3' régiójában található polimorfizmus 7 ismétlődést tartalmazó változata
A9 allél	A humán DAT gén 3' régiójában található polimorfizmus 9 ismétlődést tartalmazó változata
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder, figyelemhiányos hiperaktivitási zavar
Arg	arginin
ASA	allél-specifikus amplifikáció
ATP	adenozin-trifoszfát
bp	bázispár
BSA	marhaszérum-albumin (Bovine Serum Albumin)
C	citozin
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CNP	copy number polymorphism, gén kópiaszám polimorfizmus
CNV	copy number variation, gén kópiaszám variáció
COMT	katekol- <i>O</i> -metiltranszferáz
COS-7	afrikai zöld majom vese sejtvonala
Cys	cisztein
DAT	dopamin transzporter
dATP	dezoxi-adezin-trifoszfát
DBH	dopamin-β-hidroxiláz

dCTP	dezoxi-citidin-trifoszfát
df	degree of freedom, szabadsági fok
dGTP	dezoxi-guanozin-trifoszfát
dITP	dezoxi-inozin-trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	a négy különböző dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát 1:1:1:1 arányú keveréke
DRD4	dopamin D4-es receptor
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTT	ditiotreitol
dTTP	dezoxi-timidin-trifoszfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , bacterium
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FBS	Foetal Bovine Serum, főtális marhaszérum
G	guanin
Gly	glicin
GTP	guanozin-trifoszfát
HeLa	epithel karcinóma sejtvonala
HUGO	Human Genom Project
IMR32	neuroblasztóma sejtvonala
ins/del	inzerció / deléció
kb	kilobázis
L allél	A kutya DRD4 1. exonban lévő 24 bp ins/del hosszú allélja
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanin
LINEs	Long Interspersed Nuclear Elements
MAO-A	monoamino-oxidáz A
MAO-B	monoamino-oxidáz B
mRNS	messenger RNS, hírvivő RNS
N.E.A.A.	Non-essential aminoacid, nem esszenciális aminosavak
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, β -galaktozidáz mesterséges szubsztrátja
P allél	A kutya DRD4 2. intron hosszúság polimorfizmus rövid allélja
pCMV	Citomegalo-vírus promóterét tartalmazó vektor
PCR	Polimerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
pGL3-B	pGL3-Basic, promóter nélküli riporter vektor
pGL3-C	pGL3-Control, SV40 erős promótert tartalmazó riporter vektor
Q-allél	A kutya DRD4 2. intron hosszúság polimorfizmus hosszú allélja
qPCR	kvantitatív vagy real-time PCR
ρ	Spearman-korreláció
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus)
RNS	ribonukleinsav
S allél	A kutya DRD4 1. exonban lévő 24 bp ins/del rövid allélja
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Na-lauril-szulfát)
SINEs	Short Interspersed Nuclear Elements
SK-N-FI	neuroblasztóma sejtvonala

SNP	Single Nucleotide Polymorphism, egy pontos nukleotid variáció
SPSS	statisztikai programcsomag
STR	Short Tandem Repeat
T	timin
TAE	Tris-acetát-EDTA pufferoldat (10mM Tris, 2mM EDTA, pH = 8,0)
TDT	Transmission Disequilibrium Test (preferenciális allél-/haplotípus-átadás vizsgálat)
TF	transzkripció faktor
TH	tirozin-hidroxiláz
TH6 – TH10 allélok	A humán TH gén 1. intronjában található (TCAT) _n elem 6 – 10 ismétlődést tartalmazó alléljai
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats, hosszúság-polimorfizmus
β -gal	β -galaktozidáz
χ^2 -próba	statisztikai próba

1 BEVEZETÉS

A viselkedés genetikai meghatározottságának vizsgálatára a pszichiátriai kutatásokban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek. A neurotranszmitter rendszerek genetikai polimorfizmusai fontos szerepet játszhatnak a személyiségjegyek kialakításában, valamint nagyszámú pszichiátriai és pszichológiai rendellenesség hátterében állhatnak. Ilyen például a figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder), valamint bizonyos személyiségjegyek (pl.: extravertió, neuroticizmus). A viselkedés-genetikai kutatások eredményei azt mutatták, hogy a legtöbb rendellenesség becsült örökölhetősége 0,4–0,6 között van, ez az érték az ADHD esetében még magasabb 0,7–0,8. Az eredményekből látható, hogy a viselkedési zavarok genetikailag rendszerint meghatározottak, azonban komplex öröklődésűek: sok gén kis hatású változatának együttes előfordulása szerepel a zavar kialakulásának hátterében.

A fent említett rendellenességek genetikai hátterének felderítésére a pszichogenetikai vizsgálatokban egyre inkább a kandidáns gének asszociáció-analízisét végzik. Ennek során azt vizsgálják, hogy a kiválasztott gén összefüggésbe hozható-e az adott fenotípusos jeggyel. Kandidáns génként általában a neurotranszmitterek képződésében, lebontásában, illetve a jelátvitelben szerepet játszó fehérjék génjeit tanulmányozzák. Ezért a pszichiátriai illetve pszichológiai kutatások sokat foglalkoznak a monoaminerg rendszerekkel, ezen belül a dopamin rendszerrel is, mely az ösztönös magatartások, érzelmek, motiváció kialakításában, valamint a kognitív funkciókban játszik szerepet.

A pszichogenetikai kutatások egyik legtöbbet vizsgált célgénje a dopamin D4-es receptor 3. exonjában lévő hosszúság polimorfizmus, melynek hosszú génváltozatát összefüggésbe hozták bizonyos személyiségjegyekkel, mint például az újdonságkereséssel és a kitartással. Ezen ismétlődési polimorfizmus az egyik legszélesebb körben vizsgált genetikai variáció, melyet többek közt az ADHD egyik lehetséges rizikófaktoraként tartanak számon.

A viselkedés genetikai hátterének vizsgálatára (pl. ADHD) gyakran használnak állatmodelleket, a legtöbb esetben rágcsálókat. Az utóbbi időben azonban egyre több kísérletben a kutyát alkalmazzák modell állatként. Számos publikáció jelenik meg a kutyák viselkedéséről, melyekben megfelelő modellnek bizonyultak a szociális vonzódás és kötődés, az agresszió és a kooperáció terén is.^{1,2,3} Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a kutyákban is megfigyelhetőek az emberével párhuzamba állítható képessé-

gek, így a kutya alkalmas lehet az emberi viselkedés modellezésére. Mivel 2005 végére elérhetővé vált a teljes kutya genom szekvenciája, így elkezdődhettek az úgynevezett „*in silico*” vizsgálatok. Ennek során internetes adatbázisokból tölthetjük le bármely kromoszóma szekvenciáját, valamint elérhetőek az egyes génekben azonosított polimorfizmusok és mutációk is. A kutya genetikai állományáról tehát egyre több információ kerül napvilágra. Így a viselkedés-genetikai kutatások jól alkalmazható modell állatává válhat. Ezért fontos feltérképezni a kutyafajták különböző genetikai polimorfizmusait valamint ezek esetleges viselkedésbeli megjelenését.

A polimorfizmusok nagy részéről azonban még nem tudjuk pontosan, hogy hatással vannak-e egy adott fehérje expressziójára vagy működésére. A funkcionális polimorfizmusokat alapvetően két fő típusra bonthatjuk: a gén exonjaiban található változatok a géntermék szerkezetét, a nem-kódoló szakaszok polimorfizmusai pedig a gén kifejeződésének mértékét határozhatják meg.

Az utóbbi évek humán kutatásai egyre nagyobb figyelmet szentelnek a kandidáns gének intron régióiban található polimorfizmusainak vizsgálatára, melyekből kiderül, hogy az egyes szekvencia / allél variánsok hatással vannak-e a génexpresszió mértékére. Viselkedés-genetikával kapcsolatos funkcionális vizsgálatról kutyákban azonban igen kevés irodalmi adat állt rendelkezésünkre. Így a humán eredményekből kiindulva érdekesnek találtuk hasonló funkcionális vizsgálatok elvégzését kutyákban is.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Humán genom variációi

A Human Genom Project (HUGO) eredményeként 2001 júniusában befejeződött az emberi genom szekvenciájának meghatározása. Ennek alapján tudjuk, hogy a humán genom információtartalmának kb. 1%-a fejeződik ki fehérjékben. A fennmaradó 99% egy része nem fehérjét kódoló szekvencia, ilyenek az RNS-ek génjei, a génexpressziót szabályozó régiók, valamint a promóterek. A teljes genom ismeretében már látható, hogy bármely, egymással nem rokon személy DNS-szekvenciája kb. 0,1%-ban különbözik.⁴ Az allélvariánsok elterjedési gyakorisága alapján polimorfizmusokat vagy mutációkat különböztetünk meg. A polimorfizmusok általában semlegesek, vagy kis hatásúak, míg a mutációk valamilyen funkció kiesést jelentenek. Polimorfizmusnak nevezzük azokat az allélváltozatokat, melyek gyakorisága egy adott populációban legalább 1–2%. A szakirodalom azonban ebben a tekintetben nem teljesen egységes, ismert olyan meghatározás is, miszerint a genetikai polimorfizmus gyakoribb alléljának a frekvenciája legfeljebb 95%.⁵

A polimorfizmusok két nagy csoportját különböztetik meg: az egyikbe tartoznak a hosszúság polimorfizmusok, a másikba pedig a báziscserék. Ez utóbbiakat egy pontos nukleotid polimorfizmusoknak (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) is nevezik, melyek átlagosan 1000-2000 bázispáronként fordulnak elő és az egyéni variációk kb. 90%-ért felelősek. Ezeket a szekvencia módosulásokat számos „népbetegség” (cukorbetegség, magas vérnyomás, szkizofrénia, szívbetegségek) esetében vizsgálták.^{6,7,8} Az NCBI (National Center of Biotechnology Information) adatbázisában megtalálható a humán genomban azonosított több mint 8 millió SNP⁹, melyek kialakulhattak inzercióval, delécióval, szubsztitúcióval.

A polimorfizmusok másik nagy csoportja a hosszúság polimorfizmusok, melyek leggyakrabban hosszabb-rövidebb szekvenciák különböző számú ismétlődései és az egyéni variációk kb. 10%-áért felelnek. Ezek előfordulhatnak a genomban szétszórva, vagy koncentrálódhatnak egy helyre, és további csoportosításuk általában az ismétlődő DNS szakasz hossza alapján történik. Az elszórtan elhelyezkedő ismétlődő régiók lehetnek röviddek (Short Interspersed Nuclear Elements, SINEs), amelyek hossza 100–300 bp, 1–2 millió példányban fordulnak elő, és a genom 10–15%-át teszik ki. Ide tartoznak például az Alu ismétlődések (300 bp), melyek az *Alu* I restrikciós enzim hasítási helyét tar-

talmazzák. A hosszabb ismétlődésű régiók (Long Interspersed Nuclear Elements, LINEs) mérete 6–8 kb és a humán genom mintegy 20–25%-át alkotják. A hosszúságpolimorfizmusok másik nagy csoportja, az azonos helyen felsokszorozódó váltakozó ismétlődések (szatellit DNS). Ezek az ismétlődések szintén több csoportba sorolhatók az ismétlődő szekvencia hossza és száma alapján. Az 1–6 bp ismétlődésével kialakuló mikroszatelliták az STR-ek (Short Tandem Repeat). Nagyrészüket nem-kódoló régióban találhatók, melyek variánsai általában semleges hatásúak, szelekciós előnyük eddig még nem ismert. Idegrendszeri megbetegedésekben azonban a kódoló régióban is előfordulnak. A hosszabb szekvencia ismétlődését változó számú ismétlődési polimorfizmusnak (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) nevezzük. A VNTR esetében 6–100 bp hosszúságú szakasz ismétlődik 10–100-szor. Általában nem-kódoló régiókban találhatók (ez alól az általunk vizsgált egyik VNTR kivételt képez, mivel exonban helyezkedik el), ennek ellenére nagy jelentőséget tulajdonítanak nekik a transzkripció szabályozásában, valamint egyes elképzelések szerint a translációra és az mRNS-ek stabilitására is hatással vannak.¹⁰

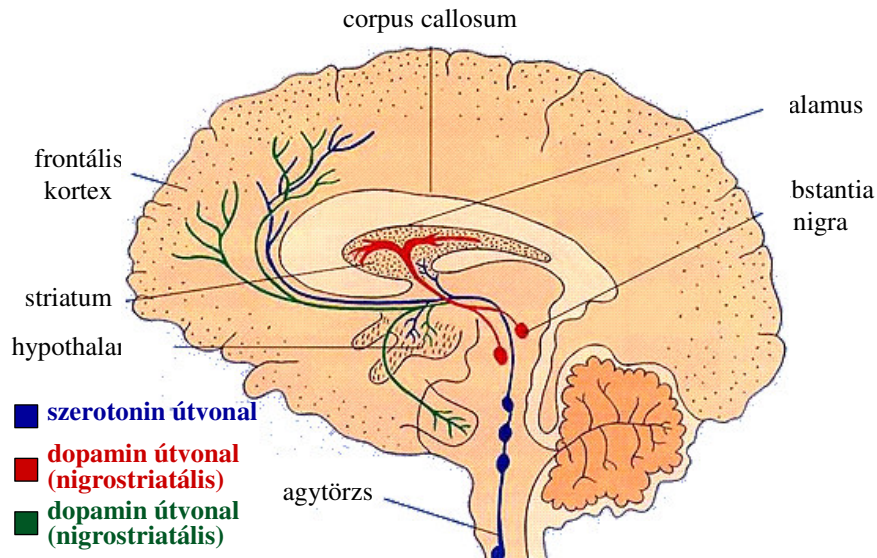
A VNTR-ek és az STR-ek esetében is nagy variabilitás jellemző. Mivel ezek mendeli öröklődést mutatnak, így különböző betegségek genetikai hátterének vizsgálata során markerként alkalmazhatók.¹¹

2.2 A dopaminerg pályarendszer

A dopamin a katekolaminok közé tartozó neurotranszmitter, melynek fontos szerepe van a különböző mentális funkciókban, valamint a viselkedésben is. Számos pszichológiai és pszichiátriai vonatkozása már bizonyított.

Az agy dopamin rendszere három jól körülhatárolható pályarendszerekből áll. Ezek közül a már előbb említett funkciókra a középagy ventrális tegmentumából induló mesolimbikus és mesokortikális pályák vannak legnagyobb hatással. A mesolimbikus pálya a limbikus rendszer (nucleus accumbens, amygdala, hippocampus) felé tart, az ösztönös magatartások, az érzelmek és a motiváció kialakításában vesz részt. A mesokortikális pálya a prefrontális kéreghez irányul, és a kognitív folyamatokban játszik szerepet. A harmadik pályarendszer a nigrostriális pálya, mely a substantia nigrából, a putamen és a nucleus caudatus felé vezet, és a mozgáskoordinációért felelős (1. ábra). Az 1. ábrán látható még a szerotonerg útvonal, mely az agytörzs raphe magja-

iből indul ki és diffúz összeköttetésben áll a limbikus rendszerrel, a nagyagykéreggel valamint a bazális ganglionokkal.



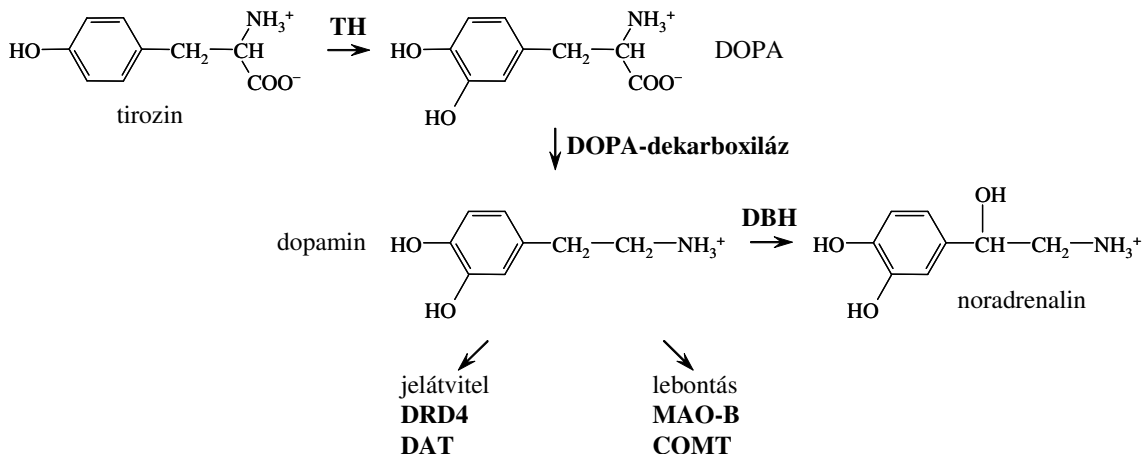
1. ábra: Monoaminerg pályarendszerek anatómiai lokalizációja.

A dopamin szintézisében és lebontásában számos enzim és receptor vesz részt. Az 2. ábrán látható, hogy a dopamin szintézise tirozinból történik. Első lépését a tirozin-hidroxiláz (TH) katalizálja, mely egy kevert funkciójú oxigenáz, molekuláris oxigén felhasználásával meta pozícióban egy hidroxilcsoportot épít a tirozinba melyből így 3,4-dihidroxi-L-fenilalanin (L-DOPA) képződik. Az L-DOPÁ-t a DOPA-dekarboxiláz alakítja tovább, és dopamin keletkezik.

A tirozin-hidroxiláz, mely a katekolamin szintézis sebesség-meghatározó lépése, és a DOPA-dekarboxiláz egyaránt a citoszolban található enzim, és itt keletkezik a dopaminerg neuronokban a dopamin is. A dopamint a dopamin- β -hidroxiláz (DBH) alakítja tovább noradrenalinná.

A lebontásban két enzim játszik szerepet: a monoamino-oxidáz (MAO) valamint a katekol-O-metiltranszferáz (COMT). Két MAO izoenzim létezik, az egyik a MAO-A, melynek a szubsztrátja elsősorban a noradrenalin és szerotonin, a másik a MAO-B, mely nagyobb affinitással bontja a dopamint.

A dopaminerg rendszer egy másik fontos eleme a dopamin transzporter (DAT), mely a dopamin visszavételében játszik szerepet. Ez a fehérje a targetje az amfetamin-szerű stimulánsoknak (pl. metilfenidát) is.



2. ábra: A dopamin metabolizmusa. *TH*: tirozin-hidroxiláz, *DBH*: dopamin- β -hidroxiláz, *DRD4*: dopamin D4 receptor, *DAT*: dopamin-transzporter, *MAO-B*: monoamino-oxidáz B, *COMT*: katekol-O-metiltranszferáz.

2.3 Dopamin D4-es receptor (*DRD4*)

A dopamin receptor D4-es típusa a fent említett három pályarendszer közül leginkább a mesokortikális pálya végterületein fordul elő. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok családjába tartozik, melynek tagjai az ősi opszin génből fejlődtek ki. A receptor-család különböző tagjai nagyfokú homológiát mutatnak a fehérjeszerkezet terén. Hét transzmembrán domént tartalmaznak, és a GTP-kötő fehérjéhez kapcsolt jelátviteli folyamatokban vesznek részt. A receptor-család magas diverzitásának kialakulásában nagyrészt a génduplikáció folyamata játszott szerepet. A család legismertebb tagjai közé olyan tartozik a rodopszin ill. az α - és β -adrenerg receptorok.

A D1-szerű receptorok (dopamin D1-es és D5-ös) növelik, míg a D2-szerűek (dopamin D2-es, D3-as és D4-es) csökkentik az intracelluláris cAMP-szintet, így ezen utóbbiak lassú inhibitoros hatást közvetítenek.¹² Ezen kívül a két szubtípus exon-intron szerkezetében is jelentős eltérés mutatkozik, a D1 család tagjainak génjei nem tartalmaznak intronokat szemben a D2-szerű receptorok génjeivel. Ez a génstruktúrabeli különbség a két géncsalád divergens fejlődésével jött létre.¹³

2.3.1 Humán DRD4 gén polimorfizmusai

2.3.1.1 Polimorfizmusok az exonokban

A DRD4 génje a 11. kromoszóma rövid karjának telomer régiójában helyezkedik el, és 4 exonból áll (NM_000797).

Egy német kutatócsoport az 1. exonban leírt egy 21 bp-os deléció, amely a receptor első transzmembrán régiójában hét aminosav kiesését eredményezi. Ez a deléció igen ritka, eddig mindössze egy pánik- és kényszerbetegségben szenvedő személynél sikerült kimutatni.¹⁴ A régió másik deléciós variánsának (13 bp deléció) előfordulása az előbbinél gyakoribb (2%). Ez a 13 bp deléció leolvasási keret eltolódást (frame shiftet) okoz, ennek hatására egy stop kodon alakul ki, melynek eredményeképpen funkcióképtelen, csonka fehérjét jön létre.¹⁵ Szintén az 1. exonban található egy 12 bp-os duplikáció, melynek gyakorisága 92%.¹⁶ Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, nem okoz funkcionális elváltozást.

A dopamin D4-es receptor kódoló régiójának legszélesebb körben vizsgált polimorfizmusa a 3. exonban található 48 bázispárnyi, 2–10-szer ismétlődő hosszúság-polimorfizmus, mely a fehérje harmadik citoplazmatikus hurkának hosszúságáért felelős.¹⁷ Megállapították, hogy az ismétlődő szekvenciák nukleotid sorrendje nem mindig azonos, így mostanáig összesen 35 változatot írtak le. Több különböző populáció vizsgálata során kiderült, hogy a 48 bp VNTR allélgyakorisága igen eltérő lehet.¹⁸ Az allélok eredetét vizsgálva, arra a megállapításra jutottak, hogy a 4-es allél volt az ősi és egyenlőtlen rekombinációk sorozatával alakultak ki belőle 2–6 ismétlődésű változatok. Széles körben elterjedt azonban a 7-es allél is, mely evolúciósan a legfiatalabb. Ennek okát pozitív szelektív mechanizmussal magyarázzák.¹⁹ A 48 bp-os VNTR funkcionális szerepe még nem teljesen feltérképezett, azonban feltételezhető, hogy a különböző számú ismétlődést tartalmazó D4-es receptor a hosszával és térszerkezetével befolyásolja a hozzáférési felületet a jelátviteli mechanizmusokban szerepet játszó fehérjék számára.²⁰ Bár a szakirodalomban ismert erre vonatkozóan ellenkező adat is.²¹

2.3.1.2 Polimorfizmusok az 5' szabályozó régióban

Számos polimorfizmust azonosítottak a DRD4 gén 5' szabályozó régióban. Ilyen a 120 bp duplikáció, amely a régió egyetlen hosszúság polimorfizmusa. A start kodontól

upstream irányban 1240 kb távolságra helyezkedik el. Mindezt három variánst – egyszeres, kétszeres és négyszeres ismétlődés – írtak le.²² Mivel az ismétlődő szekvenencia számos, *in silico* azonosított transzkripciós faktor kötőhelyet tartalmaz (GR, MEP-1, Rad-1, Zeste, Sp-1, myogenin, MBF-1) feltételezik, hogy a duplikált forma magasabb transzkripciós aktivitást eredményez.²³

Ismert továbbá nagyszámú SNP, mint például a –521. pozícióban található citozin → timin szubsztitúció, mely a DRD4 gén promóterének egyik legszélesebb körben vizsgált polimorfizmusa. Okuyama és munkatársai mutatták ki először, hogy a polimorfizmus funkcionális jelentőségű: *in vitro* rendszerben a T-allél 40%-kal alacsonyabb transzkripciós aktivitást mutatott. Populáció vizsgálatokban a két allél megoszlása hasonló volt a japán (C: 41%, T: 59%)²⁴ és a magyar (C: 43%, T: 57%) populációban.²⁵

A másik széles körben vizsgált SNP a –616 citozin → guanin csere, melynek vizsgálatát az 5' régió direkt szekvenálásával, valamint *Ava* II (G allél esetén hasít) restrikciós endonukleázos emésztéssel végezték.^{26,27} Munkacsoportunk az RFLP mellett egy allél-specifikus amplifikációs (ASA) módszert is kidolgozott a –616 C/G SNP genotípusának megállapítására, valamint kimutatta, hogy a polimorf hely közvetlen szomszédságában elhelyezkedő –615. bázis is polimorf, és emiatt az *Ava* II enzim a –616-os helyen álló bázis azonosítására nem alkalmazható megbízhatóan. Ennek megfelelően a –616 C/G SNP vizsgálatára a *Sau*96 I restrikciós enzim alkalmazását vezették be. A G allél gyakorisága 48%-nak, a C allél pedig 52%-nak bizonyult a magyar populációban.²⁸

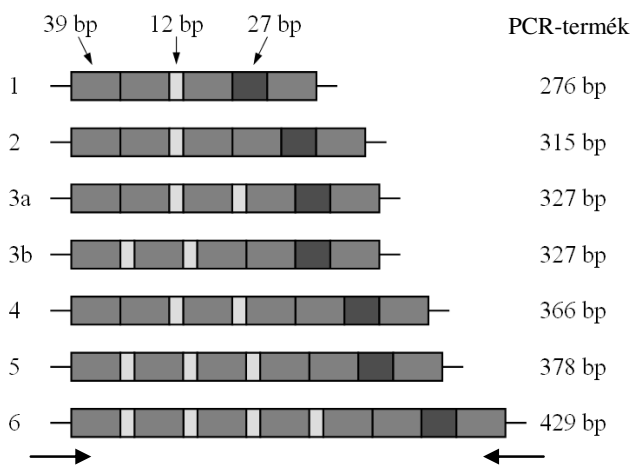
A –615. pozícióban található egy A/G SNP, melyet munkacsoportunk azonosított. A polimorfizmus G alléljának frekvenciája a magyar populációban 13,21%,²⁸ esetleges hatása a gén expressziójára még nem bizonyított.

Munkacsoportunk az előbb említett polimorfizmuson kívül azonosított egy 27 bp deleléciót is a DRD4 5' szabályozó régiójában, mely a –521 C/T SNP szomszédságában található. A deleció allélfrekvenciája mindössze 0,16% volt a magyar populációban.²⁹

2.3.2 *Kutya DRD4 gén polimorfizmusai*

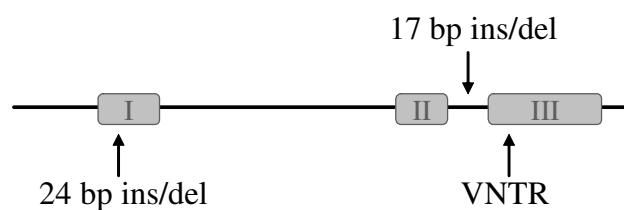
A humán DRD4 gén 3. exonban található hasonló ismétlődési polimorfizmust egyéb emlős fajokban is kimutatták, mint például lovakban,³⁰ nem humán primátákban³¹ valamint kutyákban,³² rágcsálókban azonban nem találták meg.³³

A kutya DRD4 gén a 18. kromoszómán helyezkedik el. A gén 3. exonjában megtalálható a humán polimorfizmusnak megfelelő VNTR, amely az emberben előforduló ismétlődéstől valamelyest eltérő felépítésű. A kutyákban a VNTR 27, 39, és 12 bp hosszú szakaszokból áll, a régió polimorf jellegét a 39, és 12 bp-os egységek váltakozó ismétlődése okozza (3. ábra). Mindeztől kezdve a 3. ábrán látható hét allélt írtak le.³² A DRD4 gén ezen variációja összefüggésben lehet bizonyos viselkedési jegyekkel, mint például az ingerlékenységgel vagy az agresszióval.³²



3. ábra: A DRD4 3. exonban levő ismétlődő egységek. 39- (középszürke), 12- (világosszürke) és 27-bp (sötétszürke) modulok.³² Az ábrában és jobb oldalán láthatók az allélok neve és a PCR-termékek mérete. A nyilak a betapadási primerek helyét jelzik.

Egy másik japán kutatócsoport 28 kutyafajtában vizsgálta a DRD4 VNTR allélfrekvenciáit és viselkedésbeli különbségekkel társította azokat.³⁴ Ugyanezen munkacsoport kimutatta az 1. exonban egy 24 bp deléciót is, mely feltételezhetően analóg a humán 12 bp duplikációval, ami szintén az 1. exonban található (4. ábra).



4. ábra: A dopamin D4-es receptor gén polimorfizmusai. A szürke téglalapok az exonokat jelölik.

A különböző kutyafajtákban a fent említett polimorfizmusok allél gyakorisága jelentősen eltér, esetleges hatásuk a receptor funkcióra illetve a viselkedésre még kevésbé ismert.

Szintén egy japán kutatócsoport kimutatótt egy új polimorfizmust a 2. intronban (17 bp deléció) (4. ábra), mely homológ a humán DRD4 intron 2 régióval.³⁵ 28 kutyafajtában és a farkasok két altípusában vizsgálták a különböző allél-frekvenciákat. Az 1. exont (93 bp), a 2. intront (116–133 bp) és a 3. exont (202 bp) direkt szekvenálással elemezték. Az amplifikált exonok nukleotid és aminosav szekvenciája 93,9%-os hasonlóságot mutatott az ember és kutya között. A vizsgálat során két változatot, egy hosszú (*Q*) és egy rövid (*P*) allélt azonosítottak. Két csoportba sorolták a vizsgált kutyafajtákat, nyugati („occidental”) és keleti („oriental”) fajtákra. A *Q* allél a keleti fajtákban nagyobb gyakorisággal fordult elő (átlag allél-frekvencia = 0,848), míg a *P* allél inkább a nyugati fajtákra volt jellemző (átlag allél-frekvencia = 0,616).

2.4 Tirozin-hidroxiláz (*TH*)

A tirozin-hidroxiláz a katekolamin szintézis sebesség-meghatározó enzime. A tirozinból történő dopamin szintézis első lépését szabályozza, melynek során tirozinból készít DOPÁ-t.

2.4.1 Humán *TH* gén polimorfizmusai

A *TH* gén a 11. kromoszóma rövid karjának telomer végén helyezkedik el, és 13 exonból áll (NM_000360, NM_199292, NM_199293).

A leggyakrabban vizsgált polimorfizmus az első intronban lévő mikroszatellita változó számú ismétlődése. Hét allélt írtak le, a (TCAT)_{*n*} elem 5–11 ismétlődési száma alapján.³⁶ Úgy vélték, hogy a polimorfizmus összefüggésben áll a katekolamin visszavétel sebességével. A 9 ismétlődést tartalmazó allél felelős a noradrenerg idegek alacsony ingerlékenységéért.³⁷ Egy másik kutatócsoport szerint a *TH* génben található VNTR-nek enhanszer szerepe lehet,³⁸ így feltételezhető, hogy a régió fontos szerepet tölt be a mesolimbikus jelátvitelben. Ezen kívül az első exon 3' végén találtak egy alternatív splice helyet, ezáltal négy különböző féle mRNS képződése lehetséges.³⁹ Ez a polimorfizmus feltételezhetően közvetlen hatással lehet az alternatív splicing-ra. Korábbi tanulmányok számolnak be arról, hogy a különböző génvariánsok hatással lehetnek a dopaminerg útvonalra, mivel jelentősen módosítja a metabolit koncentrációt mind az agy-gerincvelői folyadékban,⁴⁰ mind pedig a szérumban.⁴¹

2.4.2 *Kutya TH gén polimorfizmusai*

A 18. kromoszóma hosszú karján található a tirozin-hidroxiláz génje, mely 13 exont tartalmaz (ENSCAFG00000010099).

A szakirodalomban csak kevés adat állt rendelkezésünkre a *TH* génben fellelhető polimorfizmusokról. Mindezidáig egy japán munkacsoport⁴² foglalkozott ezen gén variációival. A gén kódoló régiójában négy SNP-t azonosítottak: két citozin → timin szubsztitúciót a 97. (97C/T) és a 264. (264C/T) pozícióban valamint két guanin → adenin cserét a 168. (168A/G) és 180. (180A/G) nukleotidnál. A 97C/T SNP arginin → cisztein aminosav cserét okoz. A polimorfizmusok genotípus- és allél-frekvenciáját öt különböző kutyafajtában vizsgálták, és a kapott értékek fajtánként jelentősen eltértek.

Nukleotid szinten a *TH* gén hasonlósága az emberével 87%, az egérrel 83%, a patkányval 82% és a szarvasmarhával 89% hasonlóságot mutatott.

2.5 Dopamin- β -hidroxiláz (*DBH*)

A dopamin- β -hidroxiláz katalizálja a dopamin átalakítását noradrenalinná, és a centrális noradrenerg és adrenerg neuronok vezikuláiban lokalizálódik. A *DBH* enzimaktivitás jól mérhető a szérumból, mert az enzim szimpatikus aktivitás hatására felszabadul a vezikulákból.

2.5.1 *Humán DBH gén polimorfizmusai*

A gén a 9. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, 12 exonból áll (NM_000787). A start kodontól upstream irányban (–1021 bp) található egy C/T SNP (rs1611115). Összefüggést találtak ezen SNP és a *DBH* szérumszintje között, és megállapították, hogy ezek a variánsok szerepet játszhatnak a szabályozásban, valamint befolyásolhatják a gén expresszióját.⁴³

A 11. exonban is leírtak egy SNP-t (rs6271), mely aminosav cserét okoz (arg535cys). Ez az SNP nem kapcsolódik a fent említetttel, és úgy tűnik, ez az egyetlen olyan aminosav cserét okozó SNP a *DBH* génben, mely független a plazma *DBH* aktivitástól.⁴⁴

A *DBH* gén 5. intronjában is található egy SNP (rs2519152), mely általánosan megtalálható az európai lakosság körében. Könnyen genotipizálható, mivel a *Taq* I endonukleáz restrikiósan hasítja azt.

2.5.2 *Kutya DBH gén polimorfizmusai*

A gén szintén a 9. kromoszómán található és 12 exont tartalmaz.

A génben található polimorfizmusokról szintén kevés irodalmi adat állt rendelkezésünkre. Ugyanaz a japán munkacsoport⁴² foglalkozott a *DBH* génnel, akik a fent említett *TH* génben is azonosítottak egy pontos nukleotid kicserélődéseket. A *DBH* gén kódoló régiójában két SNP-t írtak le, melyek aminosav cserét is okoznak. Az egyik a 789. pozícióban egy C/A szubsztitúció, mely aszparagin → lizin aminosav cserét okoz. A másik az 1819. pozícióban lévő A/G SNP, mely pedig szerin → glicin módosulást idéz elő. Öt kutya fajtában vizsgálták az allél- és genotípus gyakoriságok megoszlását, melyek nagy varianciát mutattak az egyes fajták között. Összevetették továbbá a kutya *DBH* gén szekvenciáját más fajokéval, mely a következő eredményt hozta: humánnal 79%-os, egerrel és patkánnyal 74%-os, a szarvasmarhával pedig 79%-os hasonlóságot állapítottak meg.

2.6 Dopamin-transzporter (*DAT*)

A *DAT* gén terméke mediálja a dopamin felvételt a poszt-szinaptikus neuronoknál. Befolyásolja a szinapszisokban a rendelkezésre álló dopamin mennyiségét az agyban, beleértve a striatum, a prefrontális kortex és a hipotalamusz területét. A *DAT* gén a farmakológiai ágensek egyik fontos célpontja, melynek gátlása például csökkenti az ADHD (figyelemhiányos hiperaktivitási zavar) tüneteit. Transzgénikus patkánymodelleken jól követhető a fenotípus megváltozása, mint például a tanulási nehézségek és a hiperaktivitás,⁴⁵ melyek analógok az emberi ADHD-val.

2.6.1 *Humán DAT gén polimorfizmusai*

A *DAT* gén az 5. kromoszóma rövid karján helyezkedik el és 15 exonból áll.

A 15. exon 3' végén található 40 bp VNTR a gén egyik legszélesebb körben vizsgált polimorfizmusa.⁴⁶ Az ismétlődések száma 3 és 13 között változik, és valamennyi eddig vizsgált populációban megtalálható, habár a 9 és 10 ismétlődést tartalmazó allélok jobban elterjedtek a kaukázusi és az afrikai-amerikai populációban.⁴⁷

Az 5' szabályozó régióban számos SNP-t is leírtak. Egy tanulmány 14 SNP-t vizsgált haplotípus blokkokban és egy olyan kombinációt azonosított, mely jelentősen növelte a génexpresszió mértékét.⁴⁸ Egy másik kutatócsoport a promóter régióban 22 SNP-t vizs-

gálva hat haplotípus blokkot különböztetett meg, melyeknek promóter aktivitása szignifikánsan eltérő volt.⁴⁹

2.6.2 Kutya DAT gén polimorfizmusai

A *DAT* gén a 34. kromoszómán található, és 15 exonból áll.

Mindezidáig a kutya *DAT* génben fellelhető polimorfizmusokról nem állt rendelkezésünkre irodalmi adat.

2.7 A kutya mint modell állat

Az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően egyre inkább elfogadottá válik, hogy a kutyát, mint modell állatot használják a viselkedés vizsgálatára. Mivel a kutya (*Canis familiaris*) az embertől törzsfejlődésileg kb. 60 millió éve vált el, de hasonló szociális környezetben kialakult faj. Megjelenését valószínűleg az emberek közelségének köszönheti, az elmúlt évezredek folyamán az emberi közösségekbe jól beilleszkedett, annak szabályaihoz alkalmazkodni tudott. Az emberéhez hasonló (szociális) környezeti hatások olyan konvergens evolúciós folyamatokat indukálhattak, melyek jeleit viselkedési analógiák formájában láthatjuk.

2.7.1 Miért pont a kutya?

2.7.1.1 Domesztikáció

A mai kutyák kialakulása több szakaszra bontható. A farkasszerű őstől való elválás az archeológiai kutatások alapján mintegy 10–14000 éve történnhetett.^{50,51} Vilá és mtsai. a mitokondriális DNS polimorfizmusai alapján a kutya kialakulását mintegy 100000 évvel ezelőtre teszik, és azzal érvelnek, hogy a szétválás utáni genetikai keveredés miatt, a régészeti leleteken ez sokáig nem volt nyomon követhető.⁵² Más genetikai vizsgálatok⁵³ szerint a kutya farkastól való genetikai izolációja csupán 13–20000 évvel ezelőtt kezdődhetett el. Mindezen eredményeket összesítve, a mai általános nézet szerint a kutya domesztikációja mintegy 15–20000 éve ezelőtt kezdődött.

Az első domesztikációs lépés során a kutyák eleinte hibridizálódhattak a helyi vad kutyafélékkel, ezért genetikailag csak részben izolálódtak. A második lépés a fajták kiala-

kulása, amely néhány száz évvel ezelőtt kezdődött, és ma is tart. Így az egyes fajták részben beltenyésztett, genetikailag nagymértékben izolált alpopulációknak tekinthetők.⁵⁴ Ma a különböző fajták közötti génáramlás korlátozott mértékű. Érdekesség, hogy bizonyos fajták kialakításakor és fenntartásakor még ma is kereszteznek kutyákat farkasokkal, valamint a kutyák és farkasok hibridjei életképes, szaporodóképes állatok.

2.7.1.2 A kutya szerepe a humán viselkedési vizsgálatokban

A kutyára annak domesztikációja során hasonló evolúciós kényszerek hathattak, mint az akkor élő emberre. Ennek kapcsán a kutyában azon képességek váltak fontossá, melyek az emberi közösségekben is nagy jelentőségűek voltak.⁵⁵

Az utóbbi évek kutatásai egyre behatóbban vizsgálták a kutya viselkedését. Ezek során a kutya megfelelő modellnek bizonyult a szociális vonzódás és kötődés,^{2,56,57} az agresszió,³ és a kooperáció terén.^{1,58} Mindezen eredmények arra utalnak, hogy megvannak az emberével párhuzamba állítható képességek a kutyáknál is. A másik „kedvező” tulajdonsága a kutyáknak, hogy a ma élő egyedek többsége emberi környezetben él, szemben a viselkedés vizsgálatokhoz gyakran használt főemlősökkel. A kutyák vizsgálati alanyként való alkalmazásának további vitathatatlan előnye, hogy a főemlősökkel ellentétben, nagy számban állnak rendelkezésre.

2.7.1.3 A kutya mint a humán pszichogenetikai vizsgálatok egyik lehetséges modell állata

Elképzelhető, hogy a kutya és az emberi viselkedés közötti hasonlóság nem csupán viselkedési szinten áll fenn, hanem a háttérmechanizmusok is megegyezhetnek, akár nagyobb mértékben, mint humán-rágcsáló viszonylatban. Már több mint 200 rendelleneségről bizonyosodott be, hogy klinikai kórképét tekintve a kutyában és emberben nagyon hasonló, és több mint 40 esetben tudjuk, hogy ugyanazon géntermék megváltozásáról van szó.⁵⁴

Fontos megemlíteni, hogy az emberi figyelemhiányos hiperaktivitás számos eleme – a különböző mértékű motorikus aktivitás, koncentrációs képességek, impulzivitás, jutalmazási rendszer módosulása – fellelhető a kutyák viselkedésében is, meghatározhatja

taníthatóságukat, bizonyos szerepekre való alkalmazásukat (munkakutya, házi kedvenc, sportkutya). Így feltételezhetjük, hogy viselkedési szinten kutyában is megtalálhatóak a figyelemhiányos hiperaktivitáshoz hasonló viselkedésmódosulások.

Az egyik fontos humán jellegzetesség az ADHD-val kapcsolatban, hogy új környezetben csak fokozatosan jelentkeznek, a tesztek kezdeti fázisában nem figyelhető meg különbség az érintett és a kontroll gyerekek között.⁵⁹ Kutyáknál Head és munkatársai végeztek megfigyeléseket otthoni környezetben és új kennelben, és hasonló következtetésre jutottak.⁶⁰

2.7.1.4 Állatmodellek a hiperaktivitás genetikai hátterének vizsgálatában

A viselkedés-genetikai kutatások leggyakrabban használt állatmodelljei patkányok és egerek. Az egyik e célból kitenyésztett, de genetikai módosítás nélküli patkánytörzs a Wistar-Kyoto patkány, mely a hiperaktív szindrómákat mutatja, azonban ezek az állatok nem mutatnak impulzív viselkedést, és új averzív ingerekre hiperreaktívan válaszolnak.⁶¹ Az ebből a patkánytörzsből kitenyésztett spontán hipertenzív patkányok (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) szintén elterjedtek. Ezekre az állatokra hiperaktív viselkedés jellemző, mely új környezetben fokozatosan jelenik meg, valamint motorikusan impulzívak. Hátrányuk azonban, hogy 4–5 hetes korukra magas vérnyomás fejlődik ki, így ennél fiatalabb állatokkal kell dolgozni.⁶²

Nagyszámú publikáció számol be a hiperaktivitás és a dopamin D4-es receptor 3. exon hosszúság polimorfizmusa közötti összefüggésről. Így fontos megemlíteni azt a tényt, hogy míg a rágcsálókban ez a polimorfizmus nem fordul elő, addig kutyákban igen.

2.8 Kandidáns gének asszociáció vizsgálata

A komplex öröklődésű, poligénes jellegek genetikai tényezőinek azonosítására, egyre inkább a kandidáns gének asszociáció vizsgálatát alkalmazzák.⁶³ Ekkor azt vizsgáljuk, hogy vajon hozzárendelhető-e egy adott allélváltozat a vizsgált jelleg előfordulásához. Ennek egyik lehetséges módja az eset-kontroll vizsgálat, melynek során a beteg és az egészséges populáció géneváltozatainak gyakoriságát hasonlítjuk össze. A két populációban előforduló allél- illetve genotípus-frekvenciák statisztikai módszerekkel összehasonlíthatók. Ha a kapott értékek között szignifikáns eltérés mérhető, akkor egy adott

génvariáns és a betegség előfordulása között asszociáció állhat fenn.⁶⁴ A legnagyobb problémát az ál-pozitív eredmények jelentik, melyek sok esetben a populáció stratifikációból (populáció genetikai rétegződéséből) adódnak, ilyenkor a vizsgált alpopulációk genetikai összetétele a vizsgált jellegtől függetlenül különbözik. Másrészt a kis génhatások miatt nehéz megkülönböztetni a valódi, de gyenge asszociációt a véletlen hatásoktól.⁶⁵ A populáció stratifikáció kiküszöbölésére a családi triók analízise, azaz a transmission disequilibrium test (TDT) alkalmazható.⁶⁶ A TDT azt vizsgálja, hogy a beteg gyermeknek a heterozigóta szülők nagyobb gyakorisággal adják-e át a kandidáns alléljukat. Ha kimutatható, hogy egy adott allél preferenciálisan adódik át, akkor az adott allélváltozatot a betegség rizikófaktorának nevezik.⁶⁷

2.8.1 A humán dopaminerg rendszer génjeinek asszociáció vizsgálatai

Dopamin D4-es receptor

Számos pszichológiai és pszichiátriai kórkép mögött a dopamin rendszer zavarát tételezik fel, így kandidáns génjei is elsősorban a dopamin rendszer tagjai (receptorok, transzporterek, szintetizáló enzimek) közül kerülnek ki. Az egyik leggyakrabban vizsgált célgén a dopamin D4-es receptor, ezen belül is a 3. exonban elhelyezkedő 48 bp VNTR. Nagyszámú vizsgálat elemezte az ADHD (figyelemhiányos hiperaktivitási zavar) és a VNTR összefüggését,^{68,69} melyet a VNTR 7-es allélja és az újdonságkeresés közötti asszociáció eredménye indított el.⁷⁰ Az ADHD kórképében megtalálhatóak az újdonságkeresésre jellemző bizonyos vonások, mint például az impulzivitás is. Egy meta-analízis – amely az addig megjelent eset-kontroll és családi triók vizsgálatán alapult – alátámasztotta a VNTR és az ADHD asszociációját.⁷¹ Az 5' régióban található polimorfizmusok közül a család-vizsgálatok során ADHD-s gyerekekben a 120 bp duplikáció hosszú (2-es allél) variánsát kétszer olyan gyakran találták a kontrollhoz képest.⁷² A promóter régióban elhelyezkedő nagyszámú SNP közül az ADHD-val kapcsolatos összefüggést a –521 C/T SNP-nél nem találtak, a –616 C/G SNP analízisekor tendencia jellegű eltérést mutattak ki egy családvizsgálat során.⁷³ Egy japán kutatócsoport összefüggést talált továbbá az újdonságkereső személyiségjegyre és a –521 CC genotípus között.⁷⁴ Ez az eredmény kaukázusi populáción is megismételhetőnek bizonyult,⁷⁵ azonban ismertek ezzel ellentmondásos publikációk is.^{76,77} Ezen kívül asszociációt találtak szkizofrénias betegek és a –521 C allél között.²⁴

Tirozin-hidroxiláz

A tirozin-hidroxiláz gén egyik legtöbbet vizsgált polimorfizmusa az első intronban található (TCAT)_n elem változó számú ismétlődése. Eddig csupán két tanulmány foglalkozott a *TH* gén és személyiségjegyek asszociációjával. Az egyik esetben tendenciózus összefüggést találtak a nyolc ismétlődést tartalmazó allél (*T8*) és a neuroticizmus között kaukázusi populációban.⁷⁸ A másik tanulmány japán populáció vizsgálatáról számol be: a kilenc ismétlődést tartalmazó allél (*T9*) és az extrovertált személyiségjegy között mutattak ki szignifikáns asszociációt.⁷⁹ Korábbi tanulmányok szerint a szkizofrénia néhány kognitív zavara is kapcsolatba hozható a mesokortikális dopamin aktivitással.⁸⁰ Meloni és mtsai. a 10 ismétlődést tartalmazó allél (*TH10*) és a szkizofrénia kapcsolatáról számoltak be,³⁸ ezt az eredményt más kutatócsoportok azonban nem tudták megisméltelni.^{81,82} További vizsgálatok ugyanakkor szintén kimutattak asszociációt a kórkép és ezen polimorfizmus között: egy tanulmányban a szkizofréniában szenvedő betegekben a *TH10/TH6* genotípus megnövekedett gyakoriságát állapították meg,⁴¹ egy japán tanulmányban pedig a *TH9/TH6* genotípus bizonyult gyakoribbnak női betegek körében.⁸³ Látható, hogy az eredmények még további megerősítésre szorulnak, aminek oka részben az, hogy jelentős különbség van az allélok eloszlásában az egyes populációk között. Míg a *TH9* allél a leggyakoribb változat Japánban,⁸⁴ addig a kaukázusi populációban a *TH10* a legelterjedtebb.⁸⁵ Több vizsgálat szól a *TH* gén első intron polimorfizmus és a hangulatzavar pozitív kapcsolatáról is.^{86,87}

Dopamin-β-hidroxiláz

Számos közlemény foglalkozik a *DBH* génben előforduló nagyszámú SNP-kkel, melyek közül az egyik leggyakrabban vizsgált az 5. intronban elhelyezkedő rs2519152 számú C/T báziscsere. Egy eset-kontrol vizsgálat során szignifikáns asszociációt találtak a *T* allél és a Tourette-szindróma valamint az ADHD között.^{88,89} Mások ugyanakkor a *C* allél gyakoribb előfordulását figyelték meg az ADHD-s betegek körében.^{90,91} Tang és mtsai. szignifikáns kapcsolatot állapítottak meg a plazma DBH szintje és a fent említett SNP között, a *T* allél alacsony plazma DBH aktivitást eredményezett.⁹² Az 5' régió egy 19 bp deléció is tartalmaz, mely megnöveli a DBH aktivitást,⁹³ a rövid allél homozigóta formában depresszió kialakulására hajlamosít.⁹⁴

Dopamin transzporter

Széles körben vizsgálták a *DAT* gén 3' régiójában található VNTR és az alkoholizmus közötti összefüggést. Egy japán populáció elemzése során kimutatták, hogy a 7 ismétlődést tartalmazó allél (A7) frekvenciája az alkohol-dehidrogenáz 2 gén egyik pontmutációjával együtt szignifikánsan magasabb volt az alkoholisták körében, mint a kontrol csoportban.⁹⁵ Több független tanulmány azonban a 9 ismétlődésű allél (A9) és az akut alkoholemegvonás tüneteinek súlyossága között talált szignifikáns asszociációt,^{96,97,98} ismertek azonban a szakirodalomban ezzel ellentétes adatok is.^{99,100} Limosin és mtsai. szerint az A9 allél növeli a vizuális hallucinációk előfordulását az alkoholemegvonás során.¹⁰¹ Egy nyugat-európai mintán végzett vizsgálat eredménye szerint szintén asszociáció mutatható ki az A9 allél és az alkoholizmus (DSM IV általi besorolás; enyhe elvonási tünetek) között.¹⁰² Heinz és mtsai kutatásai azt mutatják, hogy az A9 változat csökkentett *DAT* fehérje denzitást okoz a putamenben.¹⁰³ Ezen utóbbi eredmények arra utalhatnak, hogy a *DAT* génben lévő hosszúság-polimorfizmus nem csupán genetikai marker, hanem funkcionális szerepe is lehet az alkoholista betegekben kialakuló bizonyos tünetcsoportok genetikai meghatározásában.

Az eddig összefoglalt vizsgálatokból is jól látható, hogy az asszociáció analízisek eredményei között számos ellentmondás van. Ennek számos oka lehet: a fenotípus pontos jellemzése sok esetben nehezen kivitelezhető, mivel a klinikumban alkalmazott kategóriák gyakran több, különböző háttérű kórképet ill. tünetegyüttest foglalnak magukban, s eltérőek lehetnek az egyes tanulmányokban alkalmazott diagnosztikus módszerek is. Fontos emellett szem előtt tartani azt is, hogy ezek a rendellenességek komplex öröklődésűek, tehát kialakulásukat nem csupán egy gén illetve annak variációi okozzák, hanem egyéb genetikai és környezeti hatások együttesen befolyásolják.

2.8.2 A kutya dopaminerg rendszer génjeinek asszociáció vizsgálataiDopamin D4-es receptor

Egy japán kutatócsoport³² jelentette meg az első közleményt a kutya *DRD4* gén 3. exonban található VNTR-ről, melyben már felvetik a polimorfizmus allélvariációinak esetleges kapcsolatát különböző viselkedési jellegekkel. Két kutyafajtát (golden retriever és shiba) vizsgáltak, és kimutatták, hogy az allél-frekvencia értékek szignifikánsan különböztek a fajták között. A rövid (2-es) allél volt a domináns a golden retrieverben, míg

a shibában a hosszú (5-ös) allél (3. ábra) volt a gyakoribb. Ez a két fajta a viselkedési tulajdonságaiban is teljesen eltér. Egy korábbi felmérés alapján,¹⁰⁴ amelyben a kutyafajtákat 13 viselkedési jelleg alapján csoportosították, a golden retriever egy tipikus családi kutyának, a shiba pedig őrző-védő kutyának bizonyult. Mindezekből azt feltételezik, hogy a hosszú allél összefüggésben állhat az agresszió és az ingerlékenység viselkedési jegyekkel. Ito és mtsai. 23 kutyafajta vizsgálata során hasonló eredményt kapott, melyben a hosszú alléllal rendelkező fajták agresszívebbnek mutatkoztak.³⁴ Fontos azonban szem előtt tartani, hogy az ilyen típusú megfigyelések esetlegesen félrevezetőek lehetnek. Elképzelhető, hogy a humán asszociáció vizsgálatokból is ismert populáció rétegződés⁶⁵ ezen tanulmányokban is problémát okozhat. Saját kísérleteink is (összhangban korábbi tanulmányokkal) arra engednek következtetni, hogy az egyes kutyafajták genetikai állománya meglepően eltérő. Így lehetséges, hogy bár statisztikailag kimutatható összefüggés az allél-változatok ill. a különböző viselkedési mintázatok között, de a genotípus és a fenotípus között nincs ok-okozati összefüggés.

Tirozin-hidroxiláz

Eddig csupán egyetlen publikáció számolt be a *TH* génben található SNP-k és bizonyos viselkedési jegyek összefüggéséről kutyákban.⁴² A kapott allél- és genotípusfrekvenciák jelentősen különböztek a vizsgált öt kutyafajtában (golden retriever, labrador retriever, maltese, mini schnauzer, shiba). A *TH* génben elhelyezkedő 168A és 264T allélokot találták a leggyakoribbnak a labrador retrieverben. Hart és mtsai.¹⁰⁴ besorolásának megfelelően ennek a fajtának a legalacsonyabbak az értékei az „általános aktivitás” karakter jegyben és magasak a „könnyű házbetörés”-ben az itt vizsgált öt fajta közül. Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy a *TH* génben található polimorfizmusoknak hatása lehet a viselkedésre.

2.9 Nem-kódoló polimorfizmusok funkcionális vizsgálata

A gének intronban illetve promóterben található polimorf változatainak esetleges génexpressziót befolyásoló hatásának vizsgálatára egyre gyakrabban használnak riporter gén rendszereket. Ennek az *in vitro* funkcionális vizsgálatnak a lényege, hogy a vizsgálandó szakaszt egy plazmidban levő riporter gén elé klónozzák és az így termelődött fehérje mennyiségét mérik. Az így elkészült rekombináns DNS-konstrukciót eukarióta

sejtekbe transzfektálják, ahol megtörténik a génátírás folyamata. A riporter génről átíródó fehérje mennyisége az elé klónozott intron ill. promóter szakasz sajátságaitól függ. Számos gént használnak riporter génként, mint például a β -galaktozidázt, a GFP-t (Green Fluorescent protein), valamint a luciferáz riporter rendszert, mely utóbbi viszonylag egyszerűen alkalmazható és detektálható, igen érzékeny és a keletkező jel széles fluoreszcencia tartományban mérhető.¹⁰⁵ A transzfeckcióra, azaz a plazmid bejuttatására eukarióta sejtekbe, sokféle módszert alkalmaznak. Ilyen például az elektroporáció, melynek során elektromos áram hatására permeabilizálódnak a sejtek membránjai. Ezáltal juttatható be a rendszerint linearizált DNS a sejtekbe, melynek előnye, hogy nagyobb eséllyel épülhet be sejt genomjába. Ismert továbbá a mikroinjektálás, amikor a plazmid mikropilláris segítségével juttatható be a sejtekbe.¹⁰⁶ A kémiai technikák közül a legszélesebb körben elterjedt, a kalcium-foszfát módszer, melynek során a kicsapott plazmid-DNS-t abszorbeálják a sejtek felszínére. A másik igen elterjedt módszer, a liposzóma-mediált transzfeckció. A liposzómák pozitív töltésű lipidek hálózatából állnak, ezáltal a negatív töltésű DNS-t képesek megkötni. A módszer nagy hatásfokú, egyszerű és sokrétűen felhasználható. Ismert még tranziens- illetve stabil-transzfeckció is. Az előbbi technika során, a sejtekbe bejutott plazmid nem épül be a sejtek genomjába, de a vizsgálni kívánt génszakasz expresszálódik. A sejtek osztódásakor a vektor nem szaporodik a sejtekkel, így néhány ciklus elteltével a bevitt riporter plazmid elvész a sejtvonalból.

Egy humán tanulmány foglalkozott az intron régióban lévő polimorfizmusok esetleges funkcionális szerepével.¹⁰⁷ A kísérlet során a szerotonin transzporter második intronjában található VNTR hatását vizsgálták luciferáz riporter gént tartalmazó rendszerben. A különböző számú ismétlődő szakaszokat tartalmazó régiókat klónozták a pGL3 promóter vektorba, az SV40 promóter elé. Az így elkészített vektorokat tranziens transzfeckcióval jutatták be az embrionális őssejtekbe. A 10 illetve a 12 ismétlődő elemet tartalmazó konstruktumok eltérő relatív luciferáz aktivitást mutattak, amiből arra következtettek, hogy az eltérő hosszúságú allélok különbözőképpen befolyásolták a génextpressziót. Ez a megfigyelés is alátámasztja azt a tényt, hogy a nem-kódoló régióban található polimorfizmusok is jelentős funkcionális hatással rendelkezhetnek, mivel tartalmazhatnak mind pozitív, mind pedig negatív szabályozó elemeket, ezáltal hatással lehetnek a képződő mRNS (és fehérje) mennyiségére.

Egy japán munkacsoport³⁵ már foglalkozott a DRD4 második intronjában elhelyezkedő 17 bp deléciónak lehetséges funkcionális szerepével. A polimorfizmus két allélváltozatát SV40 promótert és luciferáz gént tartalmazó vektorba klónozták és COS-7 (afrikai zöld majom vese sejtvonala) valamint SK-N-SH (humán neuroblasztóma) sejtvonalba transzfektálták. A kísérlet során nem tapasztaltak különbséget a két allél génexpresszióra kifejtett hatása között.

2.10 Gén kópiaszám polimorfizmus

A copy number polimorfizmusok (copy number variation, CNV) vagy más néven „ismétlődési szám polimorfizmusok” olyan nagyméretű ismétlődési variációk, melyek több gént is magukba foglaló kromoszómarégiókra terjednek ki. Az ismétlődő elemek hossza átlagosan 465 ezer bázispár,¹⁰⁸ a humán genom körülbelül 3-3,5%-át érintik. Mivel a genom számos területén elszórtan megtalálhatók, felmerül a kérdés, hogy ezek a genetikai variációk milyen hatással vannak a fenotípusra, okoznak-e betegséget, vagy szerepet játszanak-e valamilyen öröklött tulajdonság kódolásában, erre vonatkozóan azonban még kevés adat áll csupán rendelkezésre. Egy tanulmány kimutatta, hogy egy CNV érinti a CCL3L1 immunfehérje génjét, amely ha több példányban fordul elő a genomban akkor bizonyos mértékű védelmet jelent a HIV fertőzés esetén az AIDS tüneteinek kialakulásával szemben.¹⁰⁹ Hasonlóképpen a komplementrendszer egyik fontos eleme, a C4-es komplementfehérje génje is változó számban fordul elő a humán genomban, melyet munkacsoportunk által kidolgozott qPCR alapú technikával vizsgáltak.¹¹⁰ A C4 génnek két eltérő szekvenciájú izotípusa van, a C4A és a C4B, a C4A és C4B génszám vizsgálata klinikai szempontból is fontos lehet, mivel kimutatták, hogy mind a két izoforma relatív hiánya szerepet játszhat egyes kórképek kialakulásában. A C4B hiánya kapcsolatba hozható autizmussal¹¹¹ és narkolepsziával.¹¹² Már elkezdődtek a CNV-k kutatása különböző fajtákban, mint például egerekben. Egy vizsgálatban laboratóriumi beltenyésztett egereket teljes-genom analízisnek vették alá, melynek során 38 CNV-t találtak.¹¹³ Tudomásunk szerint kutyákban eddig ezt a fajta polimorfizmust nem vizsgálták.

3 CÉLKITŰZÉSEK

A humán pszichogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a dopamin rendszer polimorfizmusai szerepet játszanak a viselkedés variabilitásában, továbbá egyes pszichiátriai rendellenességek kialakulásában. A jelen dolgozatban a kutyát választottuk állatmodellként, és **célul tűztük ki a kutya DRD4 gén genetikai variabilitásának és ezek viselkedésbeli asszociációinak vizsgálatát.**

1. **Viselkedés genetikai asszociációvizsgálat egyetlen kutyafajtán belül: van-e összefüggés a DRD4 3. exon VNTR és a kutyára adaptált ADHD kérdőív skálaértékei között?** Humán vonatkozásban számos tanulmány támasztja alá az ADHD RS kérdőíves felmérés eredményei és a DRD4 VNTR összefüggését. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy vajon kimutatható-e a humánhoz hasonló kapcsolat kutyánál is. A humán vizsgálatok tanúságai alapján a kérdés megválaszolásához egyetlen kutyafajtát (német juhászkutya) használtunk a populáció stratifikáció elkerülése érdekében.
2. **A kutya DRD4 gén további polimorfizmusainak vizsgálata.** A DRD4 2. intron inzerció/delécio polimorfizmusa munkánk kezdetén ismert volt. Ezért célul tűztük ki ennek a polimorfizmusnak részletesebb vizsgálatát, továbbá egyéb, az emberi DRD4 génben található polimorfizmusok kutya-analógjainak felkutatását.

Vizsgálataink másik része arra irányult, hogy **új polimorfizmusokat találjunk a kutya neurotranszmisszióval kapcsolatos génjeiben,** melyek további viselkedés genetikai asszociációvizsgálatban hasznosíthatók majd.

3. **Változó számú ismétlődési polimorfizmusok (VNTR) keresése.** E célból ismétlődő szekvenciákat kerestünk a kutya genom dopaminerg génjeiben *in silico*. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az egyes ismétlődések változó számban fordulnak-e elő néhány kutyafajtában, illetve farkasban.
4. **Gén kópiaszám polimorfizmus (CNV) keresése.** A CNV egy újonnan felfedezett polimorfizmus típus emberi vonatkozásban, ehhez hasonló vizsgálatokat kutyában eddig még nem végeztek. Ezért célul tűztük ki az esetleges CNV-k felkutatását a kutya dopaminerg és szerotonerg rendszerében.

4 MÓDSZEREK

4.1 A vizsgálatban résztvevő állatok

Az általunk vizsgált populációk DNS-mintáit az ELTE Etológia Tanszéke bocsájtotta rendelkezésünkre. A vizsgálatban a következő fajták szerepeltek: 1) Belga juhászkutyák, ahol a fajtán belül elkülönítettük a Magyarországon előforduló három szőr- illetve színváltozatot: a fekete hosszú szőrű *groenendaelt* (N=105), a vörös hosszú szőrű *tervuarent* (N=101), és a vörös rövid szőrű *malinois* (N=50) változatot. 2) Összesen 309 német juhászkutya, ahol két környezetében eltérő csoportot különböztettünk meg. Az egyik csoportba a családi környezetben élő kutyák tartoztak („családi” kutya) (N=137) a másikba a rendőrség kötelékében szolgálatot teljesítő kutyák (rendőr-kutyák) (N=172). A rendőr-kutyák mintáit az Országos Rendőr Főkapitányság Kutyavezető-képző Iskola kiképző-telephelyén gyűjtöttük. Mivel előfordulhat, hogy a szolgálatra válogatott egyedek valamilyen szempontból szelektált almintát jelentenek, ezért a két csoport homogenitását is megvizsgáltuk, de nem találtunk szignifikáns különbséget közöttük. 3) 99 sziberiai husky valamint 4) 22 európai szürke farkas.

A DNS-mintavétel a vizsgálatban résztvevő állatok gazdáinak illetve a rendőrség beleegyezésével történt.

4.2 Mintavétel és DNS izolálás

A DNS-mintavétel a laboratóriumunkban kidolgozott non-invazív módon történt. Vattapálcával 10 másodperces dörzsöléssel az íny és a bucca területéről szájnyalakártya-sejteket gyűjtöttünk. Ez elegendő mennyiségű DNS-t biztosított a genotipizáláshoz. Egy kutyától két mintát vettünk. A mintát 350 µl ösztérfogatú mintavevő pufferbe helyeztük, amelynek összetétele: 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH = 8,0, 0,5% SDS, 0,2 mg/ml proteináz K. A mintákat izolálásig -20 °C-on tároltuk. A DNS-izolálást egy éjszakán át tartó 56 °C-os inkubálás előzte meg, ezalatt a sejtek lizáltak, a proteináz K pedig megemésztette a fehérjéket. A lizátum centrifugálással eltávolítható a vattapálcáról (1000 rpm, 20 perc). Az így kapott oldat 350 µl-éből történt a DNS-izolálás, melyet a Puregene DNS izoláló kit (Gentra) segítségével végeztünk.

4.3 Genotípus meghatározás

4.3.1 *In silico* analízis

Az általunk vizsgált gének szekvenciáit (a *DRD4* gén 3. exont kivéve) a GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) és az Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) adatbázisokból töltöttük le. A vizsgált gének a következők: tirozin-hidroxiláz (NM_001002966, AB097058 és ENSCAFG00000010099), dopamin- β -hidroxiláz (NM_001005263, AB097057, és ENSCAFG00000019783), dopamin-transzporter (ENSCAFG00000010574) valamint a *DRD4* (AB167773, 1. exon: AB105054, AB105053, 2. intron: AB126591, AB126590). Az exon-intron határok az Ensembl adatbázisában szereplő adatokon alapultak. A *DRD4* gén 3. exon vizsgálatához egy korábbi tanulmányban közölt szekvenciát alkalmaztunk.³²

Az ismétlődő szakaszok *in silico* keresésére a Tandem Repeats Finder webes kereső programot¹¹⁴ alkalmaztuk.

4.3.2 *Amplifikáció körülményei*

4.3.2.1 *A PCR-elegy összetétele*

A polimeráz láncreakcióban alkalmazott primereket az Oligo 5.0 software segítségével terveztük. A Qiagen[®] HotStarTaq[™] polimeráz kivet használtuk a PCR amplifikáció során, kivéve a *DRD4* gén 1. exonjának vizsgálatát. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 1 μ M mindegyik használt primerből (1. táblázat), kb. 5 ng DNS templát, 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), valamint 0,25 U Qiagen[®] HotStarTaq[™] DNS polimeráz és a gyártó által forgalmazott 1 \times puffer (1,5 mM Mg²⁺) és 1 \times Qiagen[®] Q-oldat. Az amplifikáció 10 μ l össztérfogatban zajlott. Egy második, független PCR volt szükséges a *DRD4* 3. exon „3a”-nak és „3b”-nek nevezett allélváltozatainak elkülönítésére, mivel ezek hossza azonos,³² melynek az első reakcióhoz hasonlóan a D1C felső primert használtuk, párjaként azonban a D4dogBR allél specifikus primert alkalmaztuk. A *DRD4* gén 1. exon polimorfizmusának PCR analízise Ito 2004-es cikke alapján történt.³⁴

A dNTP összetétele 200 μM dATP, dTTP, dCTP és dGTP volt mindegyik polimorfizmus analízise során, kivéve a *DRD4* gén 3. exon VNTR meghatározásában szereplő második PCR esetében. Itt 100 μM dITP-t használtunk a vizsgált szakasz magas GC-tartalma miatt. Ilyen régiók amplifikálása során a keletkező különböző méretű termékek olvadáspontja jelentősen eltér egymástól, ami előidézheti az „allél kiesés” jelenségét.¹¹⁵ Ez azt jelenti, hogy a denaturáció során a több ismétlődést tartalmazó szálak nehezebben válnak szét, így a rövidebb allélok preferenciálisan amplifikálódhatnak. Ennek kivédésére a PCR-elegyben dITP-t (dezoxiinozin-trifoszfát) használunk. A dITP alkalmazása ebben az esetben előnyös, mivel ez a molekula egy dGTP analóg, amely csak két H-kötés kialakítására képes, így a régió olvadáspontja csökken, és a GC-gazdag valamint a hosszabb fragmentum felsokszorozása is kielégítően zajlik.

4.3.2.2 A PCR-termociklus

A termociklus első lépése a 95 °C-on 15 percig tartó kezdeti denaturáció volt, melynek során szétváltak a DNS szálai és aktiválódott a HotStarTaq polimeráz enzim. Ezt 35 termociklus követte, ciklusonként három lépéssel: 1 perc denaturálás 94 °C-on, 30 sec anneálás polimorfizmusonként különböző hőmérsékleten (1. táblázat) és végül 1 perc extenzió 72 °C-on. A PCR lezárásaként a 72 °C-on történő 10 perces végső extenzió után a mintákat 8 °C-ra hűtöttük le, majd a további vizsgálatokig –20 °C-on tároltuk.

4.3.3 PCR-termékek elektroforetikus elválasztása

A PCR fragmentumok elválasztása hagyományos, alámerülő agaróz gélelektroforézissel történt. Az elválasztáshoz ún. „kevert” gélt (2% Metaphor agaróz + 1,5% agaróz) használtunk, a futtató puffer 10 mM Tris-acetátot (pH = 8,5) és 2 mM Na₂EDTA-t tartalmazott (1× TAE). Markerként 100 bp-os létrát alkalmaztunk. Az elektroforézis 10 V/cm térerő alkalmazásával történt, szobahőmérsékleten, a várt termékek méretétől függően 1–2 órán át. Az elektroforézis befejezése után a gélt 10 percig 1 $\mu\text{g/ml}$ etidium bromidot tartalmazó TAE pufferoldatban festettük. A kiértékelés BioRad GelDoc 1000 géldokumentációs rendszerrel történt.

Gének	Primer név	Szekvencia (5'→3')	T _m (°C)
TH	(4. intron) th_F	GTC TGT CTG CTG TCT GGC TCC C	65
	th_R	TGG AGA GGC TTC CTG ACA CCC	65
DBH	(4. intron) dbh_4F	CCC CTC ACC TCC AAG CAG	56
	dbh_4R	AGG GTG ATG TGG GCA GGA T	56
	(11. exon) dbh_11F	GTG AAG CCG ACC AGC CAT TG	58
	dbh_11R	CTG ATT TCT CCA GCC GTG TTG	58
DAT	(5. intron) dat_5F	GCA CCT CTC CCG CCC TCT	56
	dat_5R	TTA ACG CCA TCT ACC CTG TGA	56
	(9. intron) dat_9F	CTC CTG TGT CCC CGC TGT CTT	65
	dat_9R	GAC AGA GCA GGG CAG GGA GG	65
DRD4	(3. exon) D1c	CGC GCG TCG GGC CAA GCT G	67
	D2c	GCG GGG GGC AGG GGG CG	67
	D4dogBR*	TGG GCT GGG GGT GCC GTC C	67
	(1. exon) 24d_F**	CGC CAT GGG GAA CCG CAG	60
	24d_R**	CGG CTC ACC TCG GAG TAG A	60
	(2. intron) 17d_F***	GCC ATC AGC GTG GAC AGG T	57
17d_R	GCC CTG GCG GTT GTA ACT CA	57	

1. táblázat: Az ismétlődési polimorfizmusok azonosításához használt primerek legfontosabb jellemzői. A primerek jelentős része saját tervezésű, kivéve *: Niimi, 1999; **: Ito, 2004; ***: Nara, 2005 publikációiból vettük. F: felső-, R: alsó primer. *TH*: tirozin-hidroxiláz, *DBH*: dopamin- β -hidroxiláz, *DAT*: dopamin-transzporter, *DRD4*: D4-es dopamin receptor.

4.3.4 qPCR

A génszám változás (copy number variation) meghatározását qPCR (kvantitatív vagy real-time PCR) módszerrel végeztük. A specifikus próbákat és primereket (2. táblázat) a Primer Express (ABI) program segítségével terveztük meg. Az amplifikáció 25 μ l-es térfogatban zajlott, a reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 1 \times TaqMan PCR Master Mix (AmpliTaq Gold[®] DNS Polimeráz, dNTP Mix, TaqMan PCR Puffer és MgCl₂), 6 μ M primerek és 4 μ M specifikus TaqMan próba (2. táblázat), valamint kb. 1 ng DNS-templát.

Gének	Primer	Szekvencia (5' - 3')	Festék	Kr.
MAO-A (8. exon)	maoa8_p	CTGCCAAGATCCAC	VIC	X
	maoa8_R	TCT GAT GGA AGC TCT GGT CTG A		
	maoa8_F	TGC CAT CCC TCC AAC TTT G		
V1aR (2. exon)	v1ar_p	CACCGTGAAGATGAC	FAM	10
	v1ar2_R	GTA CAC GGT CAC GAT CAC GAA		
	v1ar2_F	TTC CCG CGC CAA GAT G		
DAT (4. exon)	dat4_p	CACGTGGAACAGCC	FAM	34
	dat4_R	GAG TGG GCG TCT GAG CAG TT		
	dat4_F	CGT GGG TCC ACT GCA ACA		
TH (8. exon)	th8_p	CAGCCTGGCCTTC	VIC	18
	th8_R	TGT ACT GCG TGC ACT GGA ACA		
	th8_F	TGT CCG CAA GGG ACT TCC T		
DBH (3. exon)	dbh3_p	CATCCCAGCCTTGC	FAM	9
	dbh3_R	TCC ATG GTG CGC CTG TCT		
	dbh3_F	GCT GCT GAA GCC CAA GAT CT		
COMT (4. exon)	comt4_p	TGCCCAGGAACACC	VIC	26
	comt4_R	CGC ACG TAT GCC AGG AAT T		
	comt4_F	CTG CTG GCT GAC AAC GTC AT		

2. táblázat: A copy number polimorfizmusok genotipizálásához használt oligók fontosabb jellemzői. MAO-A: monoamin-oxidáz A, V1aR: vazopresszin 1a receptor, DAT: dopamin-transzporter, TH: tirozin-hidroxiláz, DBH: dopamin- β -hidroxiláz, COMT: ketechol-O-metiltranszferáz. F: felső-, R: alsó primer, p: próba, Kr.: kromoszóma lokalizáció.

A próbák 5' végén riporterként FAM vagy VIC festéket, 3' végén pedig quencherként MGB molekulát használtunk. Az amplifikáció és a detektálás ABI 7300 Real Time PCR készülékben zajlott, a kezdeti 95 °C 10 perces elődenaturálást 40 kétlépcsős ciklus követte: 95 °C 15 másodpercig és 60 °C 1 percig. A detektálás minden ciklusban a 60 °C-os szakaszok alatt történt.

4.4 Tranziens transzfekció

A különböző promóter szakaszokban található polimorfizmusok génexpresszióra gyakorolt hatásának igen elterjedt vizsgáló módszere a tranziens transzfekció. A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt génszakaszt riporter gént tartalmazó plazmidba klónozza az adott sejtvonalakba juttatjuk, majd a riporter gén expressziós szintjét mérjük. A transzfektált DNS nem épül be a genomba, néhány osztódás után eltűnik a sejtől.

4.4.1 Luciferáz riporter rendszer

A kutya DRD4 2. intron polimorfizmus vizsgálatához a pGL3 luciferáz riporter rendszert használtuk (Promega). A kísérlet egyik részében a vizsgálni kívánt intron szakaszt *Xho* I és *Hind* III hasítóhelyet hordozó primerek segítségével (3. táblázat) a pGL3-Basic promóter nélküli vektorba klónoztuk a luciferáz riporter gén elé. Így a luciferáz gén átíródása, azaz a termelődött enzimfehérje mennyisége információt adott az általunk vizsgált intron esetleges promóter jellegéről. A kísérlet másik részében az intront *Mlu* I és *Xho* I hasítóhelyet tartalmazó primerekkel a pGL3-Control vektorba klónoztuk. Ebben a vektorban a luciferáz gén előtt egy SV40 erős promóter található. Az általunk vizsgált intront az SV40 promóter elé klónoztuk, így az intron esetleges szabályozó hatásáról kaptunk információt.

4.4.2 Transzfekeciós kontroll

A tranziens transzfekeció hatékonysága a módszer körültekintő beállítása ellenére sok esetben az egyes kísérleteken belül is igen nagy szórást mutat. Ennek kiküszöbölésére elterjedt a másodlagos riporter plazmidok belső transzfekeciós kontrollként való használata. A módszer lényege, hogy a kotranszfekektált másodlagos riporter gén expressziója az adott sejtvonalban állandó, egyedül a transzfekektált sejtek arányától függ. A kísérletben a vizsgálni kívánt gén promóterének aktivitását a kontroll riporter plazmid aktivitására normalizáljuk, kiküszöbölve így a transzfekeciós hatékonyság eltéréséből adódó hibát. Rendszerünkben a másodlagos kontroll vektornak leggyakrabban alkalmazott *E. coli*ből származó, pCMV promóterű β -galaktozidáz gént tartalmazó expressziós plazmidot használtuk.

Ezen kívül az inzernt nélküli pGL3-Basic promóter nélküli és a pGL3-Control SV40-t tartalmazó promóter vektorokat minden transzfekeciós kísérletben használtuk. Az üres pGL3-Basic vektor adta meg az alap transzkripciós aktivitást, ezt vettük egynek, ehhez viszonyítottuk a többi vektor aktivitását.

4.4.3 Plazmid konstruktumok

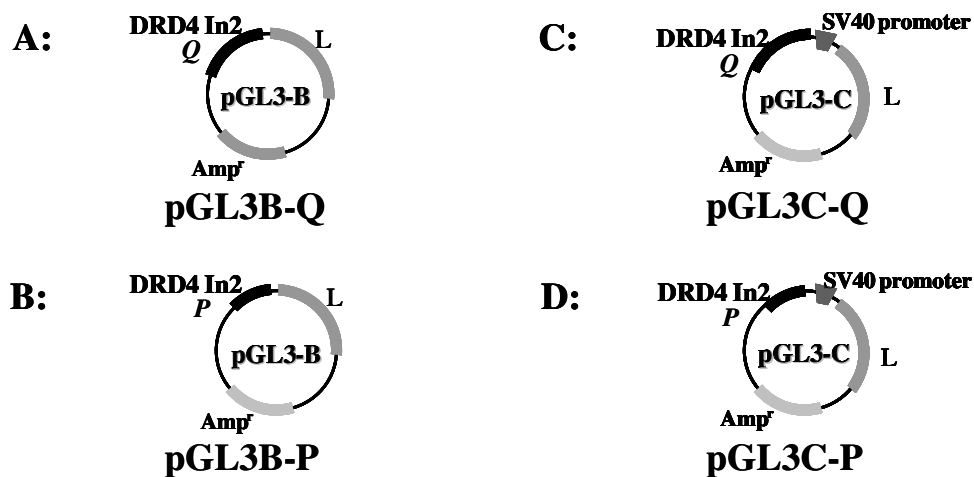
Az általunk használt összes plazmidot *E. coli* DH5 α sejtekbe transzformáltuk és termeltettük. A vektorokat Qiagen Plasmid Maxi Kit segítségével tisztítottuk. A szekvencia helyességéről minden esetben szekvenálással győződünk meg.

A konstruktumok elkészítéséhez a DRD4 gén 2. intronjának különböző (hosszú és rövid) allélváltozatát hordozó két német juhászkutya genomiális mintáját amplifikáltuk a 3. táblázatban felsorolt primerek segítségével. A pGL3-Basic vektorba történő klónozáshoz a felső primer *Xho* I restrikciós enzim hasítási helyet, az alsó primer *Hind* III adapter szekvenciát hordozott. A pGL3-Control vektorba klónozáshoz pedig a felső primerben *Mlu* I, az alsó primerben pedig *Xho* I felismerő helyet alkalmaztunk.

Primer név	Szekvencia (5'→3')
DRD4_BF	AACCTCGAGGCCATCAGCGTGGACAG
DRD4_BR	GCCAAGCTTGCCCTGGCGGTTGTA ACTCA
DRD4_CF	AACACGCGTGCCATCAGCGTGGACAG
DRD4_CR	GCCCTCGAGGCCCTGGCGGTTGTA ACTCA

3. táblázat: A konstruktumok elkészítéséhez használt primerek. A kiemelt bázisok a primerek szekvenciájában az *Xho* I, az *Mlu* I és *Hind* III hasítóhelyeket jelölik (részletesebben lásd a szövegben). Minden klónozó primer T_m értéke 60 °C volt. B: pGL3-Basic vektorba klónozás, C: pGL3-Control vektorba klónozás, F: felső primer, R: alsó primer.

A polimeráz lánreakció 10 µl térfogatban zajlott, a reakcióelegy a következő összetevőket tartalmazta: 200 µM dNTP, mindegyik használt primerből 1–1 µM, 0,25 U *Pfu* DNS polimeráz (Fermentas), 1× *Pfu* PCR puffer 2,5 mM MgSO₄-tal kiegészítve, 1× Qiagen® Q-oldat, valamint kb. 1 ng DNS templát. A PCR termociklus első lépése a 95 °C-on 3 percig tartó kezdeti denaturáció volt, ezt 35 termociklus követte, ciklusonként három lépéssel: 1 perc denaturálás 94 °C-on, 1 perc anneálás 60 °C hőmérsékleten és végül 2 perc extenzió 72 °C-on. A PCR lezárásaként a 72 °C-on történő 10 perces végső extenzió után a mintákat 8 °C-ra hűtöttük le, majd a további vizsgálatokig –20 °C-on tároltuk. A PCR-termékeket tisztítottuk (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen), majd 25 µl PCR-terméket 3 µl R⁺ pufferben (Fermentas) megfelelő restrikciós endonukleázokkal emésztettük: 1 µl *Xho* I és 1 µl *Hind* III a pGL3-Basic vektroba történő klónozáshoz, illetve 1 µl *Mlu* I és 1 µl *Xho* I a pGL3-Control vektorba klónozáshoz. Végül a hasonlóképpen emésztett pGL3-Basic illetve pGL3-Control riporter plazmidba ligáltuk (T4 DNA ligase, Fermentas). Az így elkészült plazmidok szerkezete az 5. ábrán láthatók.



5. ábra: A DRD4 2. intron variációk funkcionális vizsgálatához használt konstruktumok. A-B. pGL3-Basic (promóter nélküli) vektorba klónozott „hosszú” (*Q*), illetve „rövid” (*P*) 2. intron variáns. Az inzert közvetlenül a luciferáz gén (*L*) előtt található. **C-D.** pGL3-Control (SV40 promótert hordoz a luciferáz gén előtt) vektorba klónozott „hosszú” (*Q*) és „rövid” (*P*) 2. intron változat. Az inzert az SV40 promóter előtt van. Az inzert mérete a hosszú allél esetében: 210 bp, a rövid allélnál: 190 bp volt. *Amp^r*: ampicilin rezisztencia gén.

4.4.4 Sejtvonalak

A kísérleteink során használt sejtvonalak jellemzőit és a fenntartáshoz szükséges médiumok összetevőit a 4. táblázat foglalja össze. Minden sejtvonalat 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett növesztettük.

Sejtvonal	Eredet	Típus	Médium	FBS	N.E.A.A.	Na-piruvát
SK-N-FI	neuroblasztóma	letapadó	D-MEM	10%	–	–
HeLa	epithel karcinóma	letapadó	MEM	10%	1%	1%

4. táblázat: Az általunk használt sejtvonalak jellemzői és a fenntartásukhoz használt médiumok összetétele. FBS: magzati marhaszérum (Fetal Bovine Serum), N.E.A.A.: nem esszenciális aminosavak.

4.4.5 Transzfekciós módszerek

4.4.5.1 Transzfekciós módszerek

Az SK-N-FI és HeLa sejtvonalból kb. 10⁶ sejtet szélesztettük 6 osztatú lemezre 24 órával a kísérlet előtt. A sejtvonalak tranziens transzfekcióját Lipofectamin 2000 reagenssel (Invitrogen) végeztük a gyártó protokollja alapján. A riporter plazmidokból és a kontrollként használt pCMV- β -gal vektorból is 0,3 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. Minden kísérleti pontot három ismétlésben végeztünk.

4.4.5.2 Luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése

A transzfecciót sejtet 100 μ l 250 mM Tris-HCl-ban (pH = 8,0) vettük fel. A sejt feltárást három egymást követő fagyasztás-olvasztás ciklussal végeztük, melyet centrifugálás követett. Az enzimaktivitás mérése a felülúszóból történt. A luciferáz enzimaktivitását a Luciferase Assay System kit (Promega) segítségével határoztuk meg, a lumineszcencia méréséhez Mithras LB940 leolvasót használtunk. A β -galaktozidáz enzimaktivitását spektrofotometriával mértük az ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, mesterséges szubsztrát) hasítási rátája alapján. A promóterekre jellemző luciferáz aktivitásokat a transzfecciók kontrollként használt β -galaktozidáz aktivitásokkal normalizáltuk.

4.5 Fenotípus felvétele

A gyermekeknél a figyelemhiányos hiperaktivitás (ADHD) diagnosztizálásában leggyakrabban alkalmazott 18 kérdést tartalmazó kérdőív (ADHD becselő skála szülői verziója¹¹⁶) alapul véve etológus munkatársaink egy olyan kérdőívvel dolgoztak ki és validáltak, mely 13 kérdésből áll, és a kutya koncentráció képességét illetve aktivitás-impulzivitását vizsgálja (ADHD becselő skála gazda változata;¹¹⁷ a kérdőív a 9 Melléklet fejezetben olvasható). A kérdőív két skálát tartalmaz: aktivitás-impulzivitást és figyelemhiányt. 7 kérdés vonatkozik az aktivitás-impulzivitásra, 6 kérdés pedig a figyelemhiányra. A 13 kérdés mindegyike egy-egy állítást tartalmaz, mely bekövetkeztének gyakoriságát egy négyfokozatú skálán kell a gazdának értékelni: 0: soha, 1: ritkán, 2: rendszeresen, 3: gyakran. Az adott skálához tartozó kérdések pontértékeinek átlagát használtuk egy kutya aktivitás-impulzivitás, illetve figyelemhiány jellemzőjének értékelésére. Az aktivitás-impulzivitás skála magas értéke arra utal, hogy a gazda megítélése szerint a kutya nagy mozgásigényű, nehezen kontrollálható, míg a figyelemhiány magas értéke azt mutatja, hogy a kutya nem képes tartósan összpontosítani, figyelme csapongó.

4.6 Statisztikai módszerek

A fenotípus felvétele, kiértékelése és a statisztikai analízis az ELTE Etológia Tanszékén, dr. Miklósi Ádám vezetésével történt.

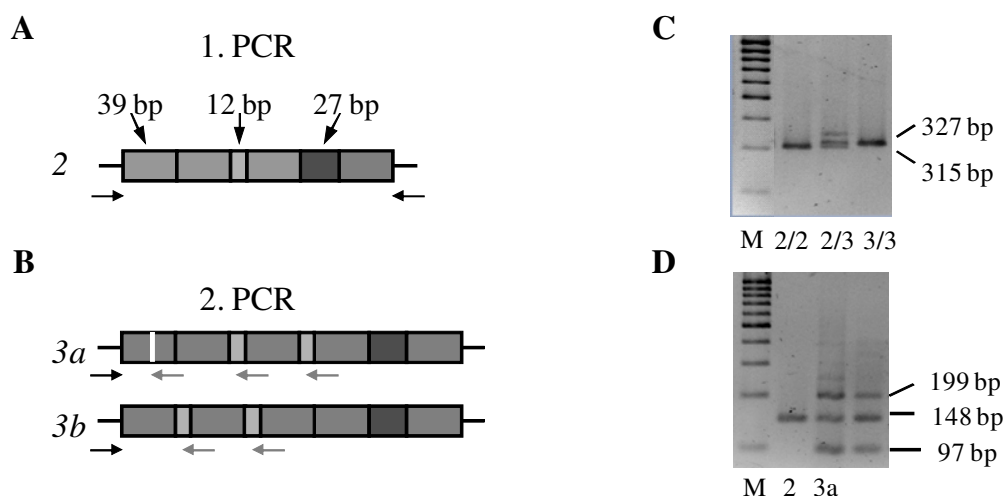
A genetikai asszociáció-vizsgálatoknál az SPSS 10.0 statisztikai programcsomagot használtuk, amely a különböző kutyafajták allél- és genotípus-frekvenciáit χ^2 -próba segítségével hasonlítja össze. Német juhászkutyáknál kétmintás t-teszttel hasonlítottuk össze a különböző genotípusba tartozó rendőr és családi kutyák skálaértékeit. A két csoportba tartozó német juhászkutyák skálaértékeit Mann-Whitney U-teszttel elemeztük, a kor esetleges hatását a két mintában Spearman rangkorrelációval vizsgáltuk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 A *DRD4* 3. exon VNTR és az aktivitás-impulzivitás mértékének összefüggése német juhászkutyák csoportjában

5.1.1 A *DRD4* 3. exon VNTR allél- és genotípus megoszlása német juhászkutyában

A *DRD4* gén 3. exonjában található VNTR azonosítására két független PCR-t alkalmaztunk. Az 1. reakció során megállapítottuk az egyes állatokban jelen lévő allélok hosszát, vagyis azt határoztuk meg, hogy a 39 és 12 bp-os modulok hányszor ismétlődnek. A genotípus meghatározás azon alapul, hogy a vizsgált szakaszt a variábilis régió kívül tapadó két primerrel felsokszorozzuk, és a keletkező PCR-termék nagyságát gélelektroforézissel azonosítjuk, ennek alapján a jelen lévő allélok hossza megállapítható (3. ábra). Ezen PCR-rel azonban a genotípus nem határozható meg egyértelműen, mert ismert két allél (3a és 3b), melyek hossza, vagyis a 39 és 12 bp hosszúságú elemek száma megegyezik, eltérő viszont ezek sorrendje (3. és 6. ábra).³² Ezért abban az esetben, ha egy állat rendelkezik 3-as alléllal, szükséges egy további PCR elvégzése is. Ebben a reakcióban az előzővel azonos felső primert alkalmazzuk egy olyan alsó primerrel kombinációban, melynek 3' vége a 12 bp-os modulokhoz kötődik. A 3a allél első 39 bp-os modulja a többi azonos méretű elemtől egyetlen bázis tekintetében eltérő szekvenciájú, így 5' vége pontosan megegyezik a 12 bp-os elemekkel. Ennek következtében a második PCR-ben az alsó primer 3a allél jelenléte esetén 3 helyre (az első 39 bp-os és a két 12 bp-os elemhez) kötődik be, ennek megfelelően 3 (97 bp, 148 bp és 199 bp) terméket kapunk. Ezzel szemben 3b allél előfordulásakor a reakció a két 12 bp-os modulról indul el, és egy 109 és egy 160 bp nagyságú terméket eredményez, így a 3a és 3b allél egymástól egyértelműen elkülöníthető. Noha a 2. PCR 3a ill. 3b allél hiánya esetén nem ad többletinformációt, egy független módszernek tekinthető az első PCR eredményének ellenőrzésére, így munkánk során rutinszerűen a genotípustól függetlenül minden egyed vizsgálata során mindkét reakciót elvégeztük (lásd 6. ábra).



6. ábra: DRD4 3. exon VNTR szerkezete és elektroforetikus képe. A-B: Az 1. és a 2. PCR sematikus ábrája. A fekete nyilak az ismétlődési szakaszokon kívülre eső primereket jelölik, a szürke nyilak a 12 bp szakaszokra (világos-szürke téglalapok) specifikus primerek tapadási helyét mutatják. **A:** 2 allél: 4 db 39 bp (közép szürke téglalapok), 1 db 12 bp és 1 db 27 bp (sötét-szürke téglalap) egységekből épül fel. **B:** 3a és 3b allél: 5 db 39 bp, 2 db 12 bp és 1 db 27 bp szakaszokból állnak. Különbség a modulok sorrendjében van, valamint a 3a allélban található egy SNP (fehér vonal) is, melyről szintén elindul a szürke nyíllal jelzett primer. **C-D:** 3 kutya DRD4 III. exon VNTR meghatározása. (A PCR termékek számított hossza a géleképek jobb oldalán látható). **C:** Az 1. PCR-t követő elektroforézis eredménye megadja az allélok hosszát, itt sorrendben: 2/2, 2/3 és 3/3. **D:** A 2. PCR-t követő elektroforézis eredménye alapján a 3a és a 3b allélok elkülöníthetők, itt sorrendben: 2/2, 2/3a, 3a/3a (3b allélt nem találtunk a mintáinkban). Markerként (M) 100 bp-os létrát használtunk.

Bár irodalmi adatok alapján számos variáció ismert, az általunk vizsgált német juhászkutya populációban csupán két allélt (2 és 3a) azonosítottunk (6. ábra és 5. táblázat).

A vizsgált kutyákat két csoportra osztottuk eltérő környezetük alapján: rendőr- és családi-kutyákra. 95 rendőrkutyát és 146 családi kutyát vizsgáltunk: a bemutatott PCR technika alkalmazásával mindkét populációban meghatároztuk a DRD4 gén III. exon VNTR allél- és genotípus gyakoriság értékeit. χ^2 -próbával hasonlítottuk össze a kapott teljes populációra vonatkozó genotípus frekvenciákat a (5. táblázat) Hardy-Weinberg egyensúly alapján számított adatokkal, és megállapítottuk, hogy szignifikáns eltérés nem mutatható ki a mért és várt értékek között ($p = 0,8528$). Ez egyrészt alátámasztja az alkalmazott genotipizáló módszerek megbízhatóságát, másrészt pedig utal arra is, hogy a vizsgált populáció túlnyomó részben egymástól független, nem rokon egyedekből áll. χ^2 -próbával összehasonlítottuk a két alcsoport (rendőr- és családi-kutyák) genotípus

megoszlását is, és megállapítottuk, hogy a két populációban mérhető genotípus frekvenciák között nincs szignifikáns különbség ($p = 0,1015$).¹

Csoport	N	Genotípus frekvencia (%)			Allél frekvencia (%)	
		2/2	2/3a	3a/3a	2	3a
Rendőr kutya	95	49,5	42,1	8,4	70,5	29,5
Családi kutya	146	38,3	45,2	16,4	61,0	39,0
Teljes minta	241	42,7	44,0	13,3	64,7	35,3

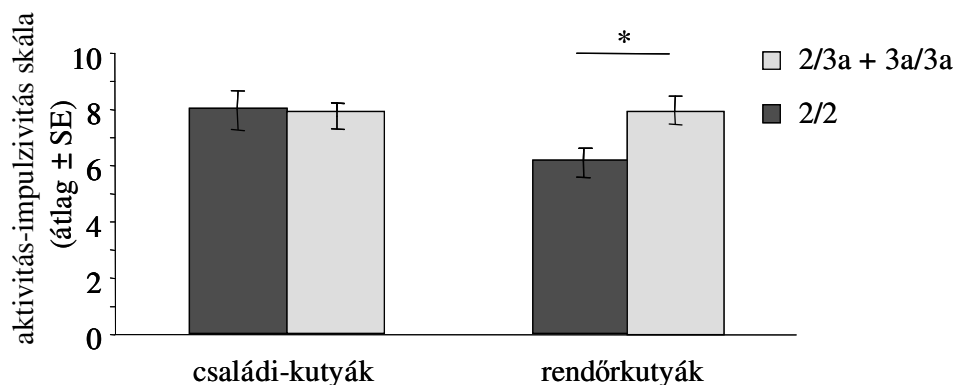
5. táblázat: A *DRD4* gén 3. exon VNTR allél és genotípus megoszlása a viselkedés genetikai asszociáció analízisbe bevont német juhászkutya populációban.

5.1.2 A *DRD4* VNTR és a kutyára adaptált ADHD kérdőív aktivitás-impulzivitás skálaértékeinek összefüggése

A 241 genotipizált kutyából 189 állat (138 kan, 51 szuka, átlag életkor \pm SD: $4,69 \pm 2,88$ év) esetében töltötték ki a gazdák a kutya-ADHD RS kérdőívet. A rendőr- (83 kan, 4 szuka, $6,70 \pm 2,22$ év) és családi-kutyák (55 kan, 47 szuka, $2,86 \pm 2,08$ év) eredményeinek átlagértékei megegyeztek, azaz nem találtunk szignifikáns eltérést az aktivitás-impulzivitás (rendőr kutya: $7,239 \pm 0,382$, családi-kutya: $7,923 \pm 0,407$; $t_{(189)} = -1,224$, $p = 0,223$), illetve a figyelemhiány (rendőr kutya: $4,816 \pm 0,322$, családi-kutya: $4,631 \pm 0,271$; $t_{(189)} = 0,441$, $p = 0,660$) skálaértékek átlagai között. A nem és a kor hatását is vizsgáltuk, mivel a rendőrkutyák többsége kan kutya volt, továbbá átlagéletkoruk a családi kutyákénál magasabb volt. A nemnek nem volt szignifikáns hatása sem az aktivitás-impulzivitásra (kan: $7,479 \pm 0,323$, szuka: $7,968 \pm 0,575$; $t_{(189)} = -0,762$, $p = 0,447$) sem a figyelemhiányra (kan: $4,709 \pm 0,244$, szuka: $4,736 \pm 0,401$; $t_{(189)} = -0,057$, $p = 0,955$). Az eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált populációban az állatok kora sem befolyásolja jelentősen a figyelmet ill. az aktivitás-impulzivitást jelleget (Spearman korreláció, figyelemhiány: $\rho = 0,044$, aktivitás-impulzivitás: $\rho = -0,206$).

A statisztikai analízis során a ritka *3a/3a* genotípus csoportot a *2/3a* heterozigótákkal összevontuk. Nem találtunk különbséget a *2/2* genotípusú kutyák és a *2/3a* + *3a/3a* összevont csoport aktivitás-impulzivitás átlagértékei között a teljes mintában ($t_{(189)} = 1,228$, $p = 0,221$), illetve a családi-kutyák körében ($t_{(102)} = -0,134$, $p = 0,895$). Ezzel szemben a *2/2* genotípusú rendőrkutyák szignifikánsan alacsonyabb aktivitás-

impulzivitás értéket értek el, mint a $2/3a$ és $3a/3a$ genotípusúak ($t_{(85)} = 2,412$, $p = 0,018$; 7. ábra).



7. ábra: Aktivitás-impulzivitás átlagértékek a családi és rendőr német juhászkutyák különböző genotípusú csoportjaiban. Sötét-szürke oszlopok: *DRD4* gén 3. exon VNTR 2/2 genotípusú egyedek, világos-szürke oszlopok: 2/3a és 3a/3a genotípusú egyedek összevonva; Az oszlopokon jelöltük a standard hiba (SE) tartományait. *: $p < 0,05$

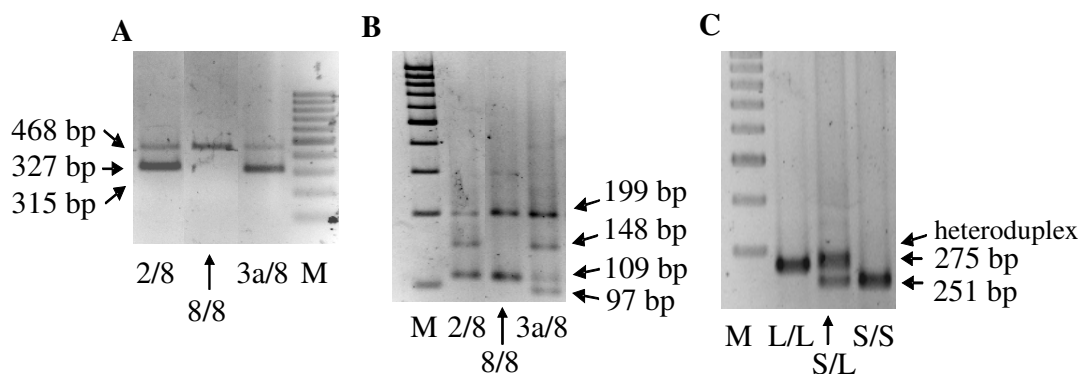
Hasonló összehasonlításban nem találtunk szignifikáns különbséget a figyelemhiány pontértékei között (teljes minta: $t_{(189)} = -0,120$, $p = 0,9074$; családi-kutyák: $t_{(102)} = 0,298$, $p = 0,7667$; rendőr-kutyák: $t_{(85)} = -0,529$, $p = 0,5985$).¹

5.2 A D4-es dopamin receptorban levő ismert VNTR-ek analízise

A *DRD4* gén 3. exonjában lévő VNTR vizsgálatát a munkánkba bevont öt kutyafajtára (tervueren, groenendael, malinois, német juhászkutya, szibériai husky) és az európai farkasokra is kiterjesztettük,³² és összehasonlítottuk a vizsgált kutyafajták és a farkasok allél- és genotípus gyakoriságait.

A *DRD4* gén 3. exon VNTR polimorfnak bizonyult az összes általunk vizsgált kutyafajtában valamint a farkasokban is. A 6. táblázatból jól látható, hogy az egyes genotípus kategóriák fajtánként jelentősen eltérnek. Hasonlóan a német juhászkutyákhoz, a belga juhászkutyákban is csupán két allél, a 2 és 3a változatot fordult elő. Érdekes ugyanakkor, hogy a genotípus- ill. allél-eloszlás még a belga juhászkutyák csoportján belül sem egységes: a tervuerenekben és a malinois-kban a 3a allél volt gyakoribb (62,5% ill. 64%), ezzel szemben a groenendaelek csoportjában ez a változat a 2 allélnál valamelyest ritkábban fordult elő (3a allél: 51,4%, 2 allél: 48,6%). A német juhászkutyákban ezzel szemben a 2 allél dominált (64%). A szibériai huskyk és a farkasok ettől jelentősen eltérő mintázatot mutattak: ebben a két fajtában az 5 allél bizonyult leggyakoribb-

nak (szibériai husky: 50,5%, farkas: 43,3%). Ebben a két állatcsoportban az irodalomban eddig nem ismert, új allélváltozatot azonosítottunk. Ez a variáns hosszabb az eddig leírt összes formánál, melynek oka az elektroforetikus kép alapján egy további 39 bp szakasz beépülése, ennek megfelelően ezt a változatot 8-as allélnak neveztük el (8. ábra).^{II}



8. ábra: A dopamin D4-es receptorban előforduló VNTR-ek vizsgálata. A: *DRD4* 3. exon ampliconok az 1. PCR során: 8-as allél azonosítása homo- és heterozigóta formában. **B:** 3a és 3b allél elkülönítése (2-es és 8-as allél is látható) a "második" PCR alkalmával. **C:** 24 bp inzerció/delécio genotipizálása az 1. exonban (L = inzerció, S = delécio). A genotípusok az elektroferogramok alatt olvashatók, a PCR termékek becsült hossza a képek mellett található. Markernek (M) 100 bp-os létrát használtunk.

Ezen új allélváltozat mind a szibériai huskykban, mind pedig a farkasokban meglepően nagy gyakorisággal fordult elő (szibériai husky: 18,2%, farkas: 29,6%). χ^2 -próba segítségével hasonlítottuk össze az egyes fajták genotípus gyakoriság értékeit ($\chi^2 = 713,31$, $df = 45$, $p < 0,0001$). A kapott eredmény alapján megállapítható, hogy statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozik az egyes csoportok genotípus eloszlás értékei között. A *DRD4* gén nem csak a 3., hanem az 1. exonban is tartalmaz egy ismétlődési polimorfizmust, amely egy 24 bp hosszúságú szakasz inzerció/delécio variációját jelenti.³⁴ A polimorfizmus genotípus meghatározását hasonló megfontolás alapján végeztük el: a variábilis szakaszt PCR-rel sokszoroztuk, a keletkező termékek méretét gélelektrofrézissel meghatároztuk, ennek alapján az egyes állatokban jelen lévő allélok közvetlenül azonosíthatók. A három különböző minta jellegzetes elektroforetikus képét a 8C ábra mutatja be. Rövid (S) allél jelenléte esetén egy 251 bp-os PCR-termék keletkezik, míg a hosszú (L) formának a 275 bp nagyságú amplicon felel meg. A képen látható második minta heterozigóta: az elektroforetikus képen mindkét fragmentum látható. Érdekes megfigyelni, hogy ezen polimorfizmus esetében is jelentős különbség figyelhető meg az egyes fajták genotípus frekvenciái között. A farkasok kizárólag, a német juhászkutyák pedig csaknem minden esetben (L allél: 97,4%) a hosszú változatot

hordozzák. Szibériai huskykban ill. a belga juhászok groenendael és malinois alfajtajában is ez az allél a gyakoribb (66,2%, 62% illetve 70,8%), a tervuerenekben ezzel szemben a rövid változat valamelyest többször fordul elő (S allél: 57,6%) (6. táblázat). Látható tehát, hogy a genotípus frekvenciák itt is nagy variabilitást mutattak az egyes fajták között, ez a különbség szintén statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($\chi^2 = 274,55$, $df = 10$, $p < 0,0001$).^{II}

Genotípus	Belga tervueren	Belga groenendael	Belga malinois	Német juhász kutya	Szibériai husky	Európai farkas
DRD4 (3. exon)						
N	100	105	50	308	91	22
2/2	14,00	29,52	18,00	41,56	3,30	4,50
2/3a	47,00	43,81	36,00	42,53	5,50	4,50
3a/3a	39,00	26,67	46,00	15,91	5,50	0,00
2/5	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	18,20
3a/5	0,00	0,00	0,00	0,00	18,70	0,00
5/5	0,00	0,00	0,00	0,00	40,60	31,90
8/8	0,00	0,00	0,00	0,00	11,00	18,20
3a/8	0,00	0,00	0,00	0,00	14,30	9,10
2/8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,10
5/8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,50
össz. %	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
DRD4 (1. exon)						
N	99	101	48	309	99	22
S/S	32,32	25,75	6,25	0,00	7,07	0,00
S/L	50,51	44,55	45,83	5,18	53,53	0,00
L/L	17,17	39,70	47,92	94,82	39,40	100,00
össz. %	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

6. táblázat: DRD4 gén 1. és 3. exon genotípusainak megoszlása (%) a különböző vizsgált kutyafajtákban és a farkasban.

5.3 A DRD4 gén 2. intron VNTR vizsgálata

5.3.1 Új ismétlődési polimorfizmus kimutatása a DRD4 2. intronban

A DRD4 2. intronban levő 17 bp inzerció/delécio polimorfizmus már ismert az irodalomból.³⁵ A szekvencia *in silico* analízise alapján azonban megfigyelhető, hogy ez a polimorfizmus egy 17 bp hosszú szakasz változó számú ismétlődésének is tekinthető. A

polimorf régió szekvenciája a 9. ábrán látható: a hosszú allél a 17 bp-os szakaszt 3 példányban tartalmazza, míg a rövid változathból a középső modul (szürke betűkkel jelölt bázisok) hiányzik.

```

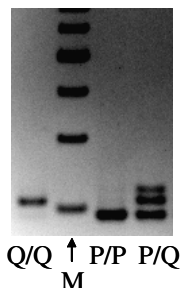
5' GTGAGCCGCCCCGCGTCGGCCCCGCCCCTCGCCAGGCCCCGCCTCGC
   GACCCGCCCCTCGCCAGGCCCCGCCCTCGCCCCGCCCCTCGCCAGGC
   CCCGCCCCGCGGCCCGCCGCCCTCACTGCGCCCCCGCAG 3'

```

9. ábra: A kutya *DRD4* 2. intron VNTR szerkezete. Az ábrán a hosszú allél látható, a kiemelt szakaszok ismétlődnek, ebben az esetben háromszor. A rövid allélban a szürkével jelzett 17 bp szakasz deletálódik. A fekete háttérrel jelzett bázis jelöli a T/C SNP-t.

A 8. ábrán azt is feltüntettük, hogy az az első ismétlődési szakaszban egy T/C SNP található. Ez a báziscsere szorosan kapcsolt a hosszúság polimorfizmussal: a T allél mindig a hosszú (Q), a C pedig a rövid (P) változattal együtt fordul elő.³⁵ Ezt a megfigyelést saját eredményeink is alátámasztják (lásd alább).

A továbbiakban megvizsgáltuk a *DRD4* 2. intron VNTR allél- és genotípus megoszlását öt kutyafajtában és farkasban (10. ábra, 7. táblázat). A polimorfizmus vizsgálata PCR és elektroforézis alkalmazásával történt: első lépésben a vizsgált régiót közrefogó primerek alkalmazásával a polimorf szakaszt amplifikáltuk, majd a keletkező PCR-fragmentumok nagyságát gélelektroforézissel azonosítottuk. A reakció során rövid allél esetén egy 193 bp-os termék keletkezett, a hosszú forma jelenlétét a 210 bp nagyságú amplikon mutatta. A gélképen (10. ábra) megfigyelhető, hogy heterozigóta minták esetében nem csupán kettő (a hosszabb és a rövidebb) termék látható. A legnagyobb molekulásúlyúnak mutató harmadik fragmentum az ún. „heteroduplex”, amely egy rövid és egy hosszú allélnak megfelelő egyszálú DNS-ből létrejövő szabálytalan dupla szálú molekula. Ez a termék VNTR-re heterozigóta minták vizsgálata során gyakran megfigyelhető, és mindig lassabban vándorol mindkét szabályos kettős szálú DNS termékénél („homoduplexnél”).



10. ábra: A *DRD4* 2. intron VNTR PCR alapú vizsgálata. A három minta sorrendben: homozigóta a hosszú allélra (Q) (210 bp), homozigóta a rövid allélra (P) (193 bp), heterozigóta. Markerként (M) 100 bp-os létrát használtunk.

DRD4 2. intron VNTR	Belga tervueren	Belga groenendael	Belga malinois	Német ju- hászkutya	Szibériai husky	Európai farkas
N	101	105	50	323	99	22
Allél frekvencia (%)						
P	39,11	52,38	56,00	67,96	5,56	100,00
Q	60,89	47,62	44,00	32,04	94,44	0,00
Genotípus frekvencia (%)						
P/P	14,85	29,52	30,00	48,30	3,03	100,00
P/Q	48,52	45,72	52,00	39,30	5,05	0,00
Q/Q	36,63	24,76	18,00	12,40	91,92	0,00
összesen	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

7. táblázat: A DRD4 2. intron VNTR allél és genotípus megoszlása (%) a különböző kutyafajtákban és a farkasban (Q: hosszú, P: rövid változat).

Amint az a 7. táblázat adataiból látható, a P és a Q allélok a groenendaelekben hasonló gyakorisággal fordulnak elő. A tervueren-ben és a szibériai huskyban a hosszú allél dominál, míg a malinois-ban és a német juhászkutyában a rövid változat gyakorisága magasabb. A farkasokban egyáltalán nem találtunk hosszú allélt. Az allélfrekvenciákból a Hardy-Weinberg egyensúlynak alapján számított genotípus frekvenciák megfeleltek a mért értékeknek (a szibériai huskyk esetében a P/P genotípusú egyedeket összevontuk a P/Q heterozigóta egyedekkel, az előbbieket kis száma miatt, így csak két kategóriára számoltuk a Hardy-Weinberg egyensúlyt), a χ^2 -próba alapján szignifikáns eltérés egyik kutyafajta esetében sem mutatkozott: tervueren $p = 0,982$; groenendael $p = 0,692$; malinois $p = 0,926$; német juhászkutya $p = 0,217$; szibériai husky $p = 0,915$.

5.3.2 A DRD4 gén 2. intron polimorfizmus funkcionális vizsgálata

Humán tanulmányokból ismert, hogy a promóter régió polimorfizmusai összefügghetnek a gén transzkripció aktivitásával, így – a DRD4 tekintetében – a sejt felszínén megjelenő receptorok mennyiségével. A kutya DRD4 génexpressziójának szabályozásáról, a promóter régió szerkezetéről nem áll még rendelkezésünkre szakirodalmi adat. Újabb tanulmányok az intronok esetleges szabályozó, transzkripciót befolyásoló funkciójáról is beszámolnak.^{107,118} Ezért megvizsgáltuk, hogy az újonnan felfedezett VNTR mutat-e működésbeli eltérést *in vitro* rendszerben.

5.3.2.1 A *DRD4* 2. intron VNTR funkcionális vizsgálata tranziens transzfekcióval két sejtvonalon

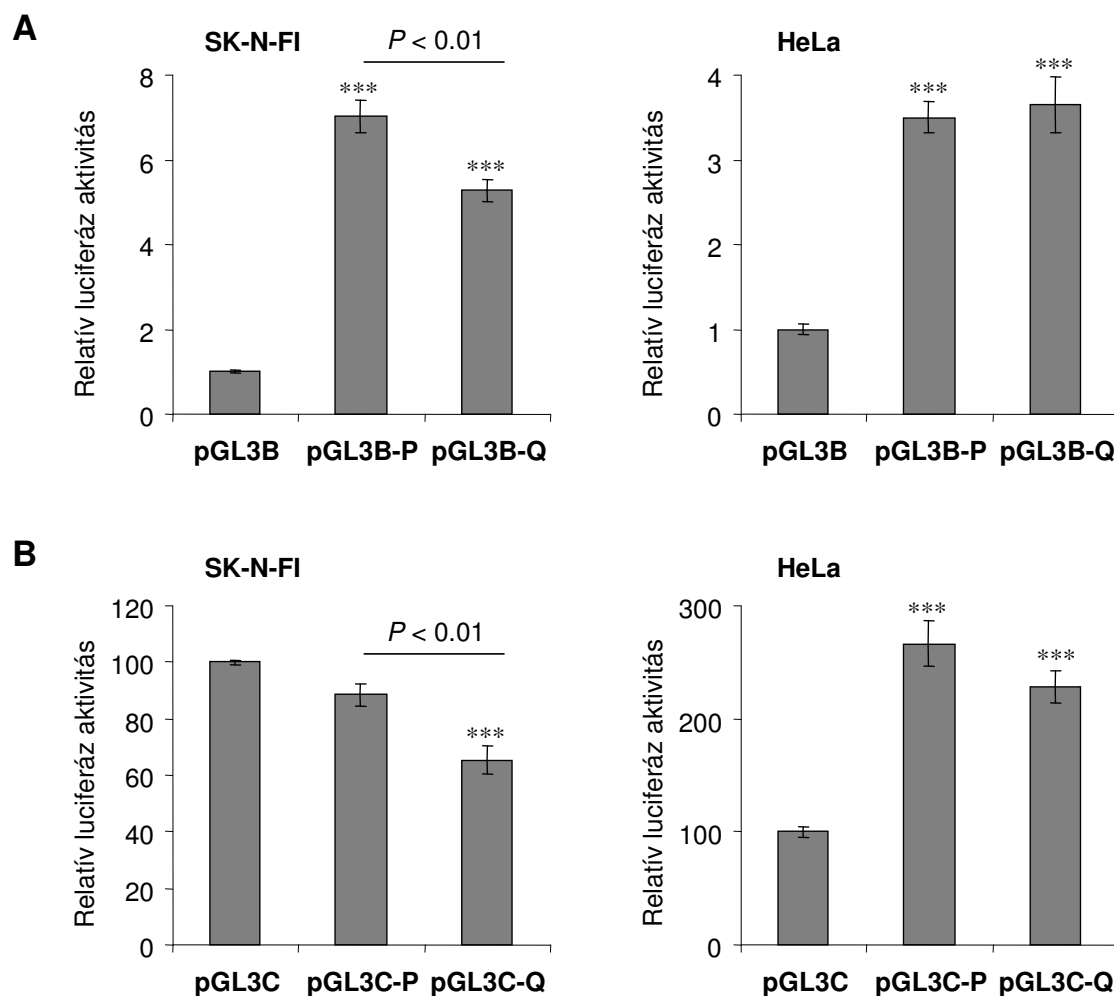
A *DRD4* 2. intron VNTR esetleges funkcionális hatását luciferáz riporter gén rendszerben vizsgáltuk. A két allél kiválasztott szakaszát pGL3-Basic (pGL3B) promóter nélküli, és pGL3-Control (pGL3C) SV40 erős promótert tartalmazó riporter plazmidba klónoztuk (lásd „Módszerek”), ezzel négyféle vektort hoztunk létre: pGL3B-P és pGL3B-Q, valamint pGL3C-P és pGL3C-Q (lásd „Módszerek”). Mivel a pGL3-B nem tartalmazott promótert, alkalmasnak látszott annak a kimutatására, hogy van-e egyáltalán promóter aktivitása a vizsgált szekvenciának. A pGL3C, erős promótert tartalmazó vektor esetében a *DRD4* 2. intron VNTR esetleges gátló (silencer) hatását kívántuk megvizsgálni. Minden transzfekciós kísérletben a pGL3-Basic promóter nélküli vagy a pGL3-Control (SV40 promótert tartalmazó), „üres” vektor alapaktivitására normalizáltuk az adatokat.

A transzfekciós kísérleteinkhez kétféle sejtvonalat használtunk fel. A neuroblasztóma (SK-N-FI) sejtvonal endogén módon is expresszálja a *DRD4* mRNS-t. Nem neuronális típusú sejtek közül az epithel karcinóma eredetű HeLa sejtvonalat teszteltük, melyben a *DRD4* expressziója igen alacsony, de kimutatható.¹¹⁹ Mindkét sejtvonal humán eredetű, kutya eredetű idegi sejtvonalak nem álltak rendelkezésünkre.

Transzfekciós kontrollként a β -galaktozidáz gén kotranszfekcióját használtuk. A sejtkivonatokban mért luciferáz aktivitás értékeit minden esetben a β -galaktozidáz aktivitás értékeivel korrigáltuk. A 11. ábra a négy konstruktum relatív (β -galaktozidázra normalizált) luciferáz aktivitás értékeit mutatja a két sejtvonalban. Az ábrán látható eredmények három kísérlet átlagából származnak. A három független kísérlet során hasonló adatokat kaptunk.

A pGL3B-P és a pGL3B-Q konstruktumok megnövelték az üres pGL3-Basic vektorhoz viszonyított transzkripciós aktivitást, mind az SK-N-FI, mind a HeLa sejtvonalban ($P < 0,001$, 11A ábra). A *P* (rövid) allél 7-szeresére növelte, míg a *Q* (hosszú) allél 5-szörösre fokozta a relatív luciferáz aktivitást a promóter nélküli vektorhoz képest a neuroblasztóma sejtvonalban (11A ábra). Hasonlóan szignifikáns, azonban mérsékeltebb (3,5-4-szeres) transzkripciós aktivitás fokozódást találtunk, mind a *P*, mind a *Q* allél variációt hordozó konstruktoknál a HeLa sejtvonalban. A pGL3B-P és a pGL3B-Q vektorok csak az SK-N-FI sejtvonalban mutattak eltérő transzkripciós mintázatot (11A

ábra). A rövidebb intron változat szignifikánsan magasabb transzkripció aktivitást eredményezett a hosszú változathoz képest ($P < 0,01$), azonban megfigyelhető még, hogy ez az allél különbség a nem neuronális eredetű HeLa sejtvonalban nem detektálható. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a kutya DRD4 gén második intron régiója alternatív promóterként működhet.



11. ábra: A 2. intron hatása a DRD4 gén expressziójára. A DRD4 2. intron VNTR *P* és *Q* allélját beklónoztuk pGL3-Basic (A) és pGL3-Control (B) luciferáz riporter vektorokba. A transziens transzfekcióhoz használt sejtvonalak: SK-N-FI és HeLa. A luciferáz aktivitást minden esetben a β -galaktozidázra normalizáltuk. A konstruktumok relatív luciferáz aktivitása (átlag \pm SD) az üres pGL3-Basic (A) vagy a pGL3-Control (B) vektor aktivitásának függvényében látható. ***: $p < 0,001$

A pGL3-Control vektor kísérleti rendszerben a rövid és hosszú allélokat az SV40 promóter elé klónoztuk. A rövid allélos (*P*) forma valamivel csökkentette a transzkripció aktivitást az üres pGL3-C-hoz képest az SK-N-FI sejtvonalban, ez a különbség statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak (11B ábra). Másrészt a *Q* allélt tartalmazó

konstrukt szignifikánsan ($P < 0,001$) csökkentette a relatív luciferáz aktivitást. Ezzel ellentétben 2-3-szoros transzkripció fokozódást ($P < 0,001$) tapasztaltunk a HeLa sejtvonalban mind a pGL3C-P és pGL3C-Q vektoroknál (11B ábra), azonban allél különbséget nem tudtunk kimutatni. Eredményeink azt mutatják, hogy a második intron VNTR régió szerepet játszhat a génexpresszió szabályozásában, de sejt specifikusan.

5.4 Ismétlődési polimorfizmusok keresése

5.4.1 VNTR-ek *in silico* keresése további kutya dopaminerg génekben

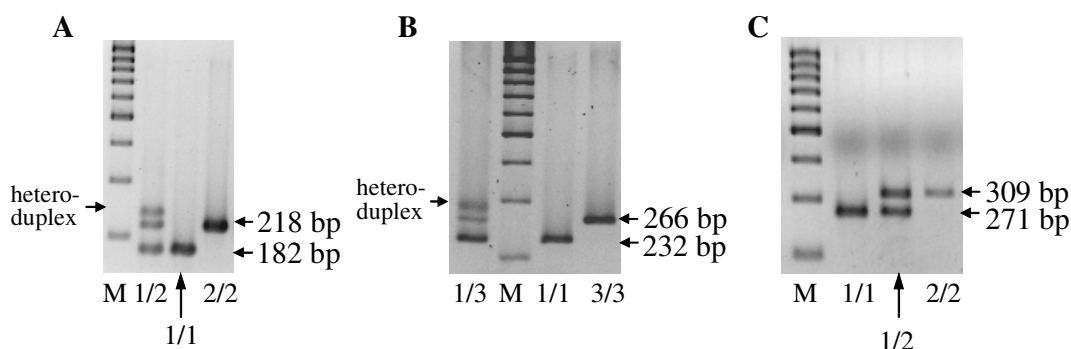
A főképpen humán populációkat elemző tanulmányok ill. biokémiai megfontolások (2. ábra) alapján a tirozin-hidroxiláz (*TH*), a dopamin- β -hidroxiláz, a D4-es dopamin receptor (*DRD4*), a dopamin transzporter (*DAT*), a monoamino-oxidáz B (*MAO-B*) valamint a katekolamin-O-metiltranszferáz (*COMT*) génekben kerestünk további ismétlődő szakaszokat. A keresést nem csak a gének kódoló régióiban (exonokban) végeztük el, a vizsgálatot kiterjesztettük az 5' szekvenciákra (1000 bp-ig), ill. az intronokra is. Az exonokban előforduló variációk ugyanis a fehérje szerkezeti módosulását okozhatják, ugyanakkor – mint az az előző fejezetekben bemutatásra került – a nem kódoló szakaszok variációi (intronokban és az 5' régióban elhelyezkedő polimorfizmusok) a génexpresszió szabályozásában játszhatnak szerepet. A keresés során nem vettük figyelembe azokat a helyeket, ahol az ismétlődő egységek hossza nem volt nagyobb, mint 6 bp, így a mikroszatellitákat kizártuk a további vizsgálatokból. Emellett csupán azokat az ismétlődő régiókat vontuk be a kísérleteinkbe, ahol az ismétlődő szakaszok szekvencia hasonlósága legalább 85% volt. Mindezen kritériumokat figyelembe véve az alábbi régiókban találtunk olyan ismétlődő szekvenciákat, melyek esetében feltételezhető volt, hogy az adott génszakaszon VNTR helyezkedik el: tirozin-hidroxiláz gén 4. intronjában található 36 bp duplikáció, a dopamin- β -hidroxiláz gén 4. intronjában levő 17 bp ismétlődés és a 11. exonban egy 24 bp duplikáció, valamint a dopamin-transzporter gén 5. intronjában egy 59 bp duplikáció és a 9. intronban egy 38 bp ismétlődés.

Az összes általunk vizsgált kutyaafajtából (tervueren, groenendael, malinois, német juhászkutya, szibériai husky) néhány mintát ($N = 48$) és a farkasokat ($N = 22$) előzetes analízisnek vetettük alá, hogy megtudjuk az *in silico* azonosított és kiválasztott ismétlődési szakaszok ténylegesen is variábilisak-e a rendelkezésünkre álló kutya populáció-

ban. Nem találtuk polimorfoknak a *DBH* gén 11. exonjában és a *DAT* gén 5. intronjában *in silico* azonosított ismétlődési szakaszokat. Másrésztől azonban ismétlődő régiókra lelünk a *TH* és a *DBH* gének 4. intronjában, a *DAT* gén 9. intronjában valamint a *DRD4* 1. exonjában az általunk vizsgált fajtákban. A VNTR-ek pontos elhelyezkedését a kromoszómákon a 11. táblázat mutatja (lásd „Eredmények megbeszélése”).

5.4.2 Új VNTR-ek vizsgálata

A *TH* gén 4. intronjában azonosított 36 bp hosszú szakasz egyszeres (1 allél) vagy kétszeres (2 allél) formában fordult elő a vizsgált populációban. A genotipizálást a korábban már részletezett PCR-en ill. gélelektroforézisen alapuló technikával végeztük el, rövid allél esetén egy 182 bp-os, hosszú forma esetén pedig egy 218 bp nagyságú terméket kaptunk. A 12A. ábra mutatja a genotípus meghatározás eredményét. Az 1 allél előfordulása ritka volt a német juhászkutyában (12,7%) és a malinois-ban (9%), a szibériai huskyban ugyanakkor 84,7%-os gyakorisággal fordult elő. A farkasok (1: 27,3%, 2: 72,7%), a goenendaelek (1: 69,7%, 2: 30,3%) és a tervuerenek (1: 40%, 2: 60%) csoportjában mindkét változatot viszonylag sok esetben megtaláltuk. (9. táblázat). Az egyes fajtákban meghatározott genotípus megoszlás szignifikánsan különbözött egymástól ($\chi^2 = 323,73$, $df = 10$, $p < 0,0001$). A vizsgált csoportokban a mért genotípus gyakoriságok statisztikailag nem tértek el szignifikánsan a Hardy-Weinberg egyensúly alapján számított értékektől (tervueren: $p = 0,706$, groenendael: $p = 0,498$, malinois: $p = 0,589$, német juhászkutya: $p = 0,999$, szibériai husky: $p = 0,860$, farkas: $p = 0,926$).



12. ábra: Új ismétlődési polimorfizmusok genotipizálása. Három kutya genotípusa olvasható le az ábráról a különböző polimorfizmusok esetében. **A:** Tirozin-hidroxiláz 4. intron VNTR (1 vagy 2 ismétlődés). **B:** Dopamin- β -hidroxiláz 4. intron VNTR (1 vagy 3 ismétlődés). **C:** Dopamin-transzporter 9. intron VNTR (1 vagy 2 ismétlődés). A genotípusok és a PCR termékek becsült hossza a géleképek alatt illetve mellett láthatóak. Markerként (M) 100 bp-os létrát használtunk.

A *DBH* gén negyedik intronjában elhelyezkedő 17 bp ismétlődés analízisének eredménye a 12B. ábrán látható. Ahogy erre a reprezentatív elektroforetikus kép is utal, érdekes módon csak egyszeres (1 allél) illetve háromszoros (3 allél) ismétlődési formákat találtunk, a két ismétlődést tartalmazó forma az általunk vizsgált állatok között nem fordult elő. A 12B. ábrán látható három különböző genotípusú (sorrendben: 1/3, 1/1, és 3/3) minta elektroforetikus képe. A háromszoros ismétlődésű változat az összes fajtában ritkán fordult elő. A legnagyobb számban a malinois-k (23,96%) hordozták, a legalacsonyabb frekvenciát a német juhászkutyákban (3,38%) mértük (8. táblázat). A genotípus eloszlás ($\chi^2 = 73,344$, $df = 10$, $p < 0,0001$) ezen polimorfizmus esetében is szignifikánsan különbözött a fajták összehasonlításakor.

Genotípus	Belga tervueren	Belga groenendael	Belga malinois	Német juhászkutya	Szibériai husky	Európai farkas
TH (4. intron)						
N	100	104	50	306	98	22
1/1	18,00	46,15	2,00	1,63	72,45	9,09
1/2	44,00	47,12	14,00	22,22	24,49	36,36
2/2	38,00	6,73	84,00	76,15	3,06	54,55
össz. %	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
DBH (4. intron)						
N	102	104	48	306	98	22
1/1	79,41	60,58	64,58	93,25	55,10	82,61
1/3	18,63	34,62	22,92	6,75	34,70	17,39
3/3	1,96	4,81	12,50	0,00	10,20	0,00
össz. %	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
DAT (9. intron)						
N	101	104	48	297	98	22
1/1	0,99	2,88	31,25	0,00	6,12	0,00
1/2	9,90	27,88	50,00	0,34	22,45	34,78
2/2	89,11	69,23	18,75	99,66	71,43	65,22
össz. %	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

8. táblázat: TH, DBH és DAT génekben levő polimorfizmusok genotípus frekvencia értékei (%) a vizsgált kutyafajtákban és a farkasban.

A *DAT* gén 9. intronjában azonosított 38 bp hosszú ismétlődő szekvencia PCR alapú vizsgálatának eredménye látható a 12C. ábrán. A hosszú változat csaknem az összes fajtában a leggyakoribb allélnak bizonyult (német juhász: 99,8%, tervueren: 94,1%,

groenendael: 83,2%, szibériai husky: 82,7%, farkas: 82,6%). Ezzel szemben a belga juhászutyák harmadik csoportjában, a malinois-k körében a rövid forma valamelyest elterjedtebbnek mutatkozott (I allél: 56,3%). Az egyes fajták genotípus frekvenciái között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott ($\chi^2 = 227,90$, $df = 10$, $p < 0,0001$), és a mért genotípus gyakoriságok megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak.^{II}

5.5 Gén kópiaszám polimorfizmus keresése

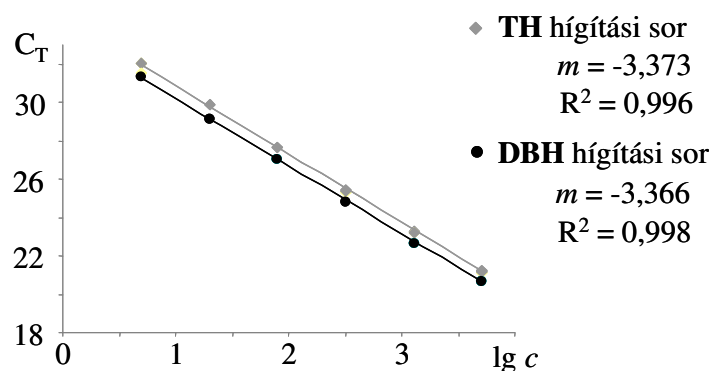
A gén kópiaszám polimorfizmus a humán irodalomban már viszonylag jól ismert, ennek analóg változatait kutyákban azonban eddig még nem vizsgálták. Ezért megpróbáltunk az általános 2 példánytól (2 homológ kromoszóma) eltérő kópiaszámú (amplifikálódott vagy deletálódott) géneket keresni a kutya dopaminerg és szerotonerg rendszerében. A vizsgált gének a következők voltak: tirozin-hidroxiláz, dopamin- β -hidroxiláz, dopamin-transzporter, monoamino-oxidáz-A, ketekolamin-O-metiltranszferáz, vazopresszin-receptor 1a.

5.5.1 Esetleges CNV-k felkutatása a kutya dopaminerg és szerotonerg génjeiben qPCR módszerrel

Bár a CNV-k az ismétlődési polimorfizmusok egy speciális típusának is tekinthetők, kimutatásuk illetve elemzésük ennek ellenére az eddig bemutatottól teljesen eltérő stratégiát igényel. Ennek magyarázata az, hogy az ismétlődő elemek hossza lényegesen nagyobb: a régiót körülvevő primerpárral nem amplifikálható. A polimorfizmus viszont mennyiségi variabilitásnak is felfogható („hány gén található a genomban?”), kvantitatív elemzések során a real-time PCR alapú eljárások eredményesen alkalmazhatók. Mivel a CNV-k vizsgálata elengedhetetlenné teszi a meglehetősen kis különbségek pontos kimutatását, ezért munkánk során a szekvencia specifikus TaqMan próbák alkalmazását választottuk. A vizsgált génekre az Ensembl adatbázisból letöltött szekvenciákat alapul véve terveztük a primereket és a specifikus próbákat. Ismert, hogy SNP-k a primerek és próbák tapadásának hatékonyságát jelentősen befolyásolhatják, ezért minden esetben olyan exonokban elhelyezkedő szekvenciákat amplifikáltunk, amelyek nem tartalmaznak semmilyen ismert polimorfizmust. A tervezett primerek és próbák elhelyezkedése és szekvenciája a 2. táblázatban található.

A génszám vizsgálata relatív kvantifikálással, a ΔC_T kiértékelési módszer alkalmazásával történt. Mivel a CNV-kkel kapcsolatban semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésünkre, így teljes biztonsággal kontroll gént sem választhattunk, ezért a kiértékelés során a vizsgált célgéneket egymáshoz viszonyítottuk. A próbák egy részét FAM, másik csoportját pedig VIC riporter festékkel jelöltük. Ez a megközelítés nem csupán a multiplexálás lehetőségét rejti magában, amellyel munka és költség takarítható meg, hanem a mérés pontossága is növelhető vele. Az egy csőben történő párhuzamos detektálás ugyanis lehetővé teszi, hogy a relatív kvantifikálásban szereplő két gén mérése egy csőben történjen, mellyel a pipettázásból adódó pontatlanság tovább csökkenthető.

Fontos kérdés volt annak vizsgálata, hogy eltérő kiindulási DNS koncentráció mellett mennyire megbízhatóak a kidolgozott TaqMan rendszerek. Ezért egy DNS mintából negyedelő hígítási sort készítettünk. A nagyobb megbízhatóság érdekében ebben és valamennyi további kísérletben is 3–3 párhuzamos mérést végeztünk. A kapott C_T értékeket a kiindulási koncentráció logaritmusának függvényében ábrázolva, egy egyenest kaptunk (13. ábra).



13. ábra: Hígítási sorozat. Mérési adatok: A kutya TH és DBH gének C_T értékei a DNS hígításának függvényében. m : meredekség, R^2 : regressziós koeficiens.

A 13. ábrán az általunk vizsgált két célgénhez, a tirozin-hidroxilázhoz és a dopamin- β -hidroxilázhoz tartozó hígítási sor látható. Megfigyelhető, hogy a két egyenes csaknem teljesen párhuzamos, ami azt bizonyítja, hogy a kidolgozott rendszer széles minta-DNS koncentráció-tartományban megbízhatóan alkalmazható a génszám meghatározására. A mérések pontosságát jelzi, hogy a pontok jól illeszkednek az egyenesekre, az R^2 -érték minden esetben meghaladja a 0,99-et.

A 9. táblázatban a vizsgált génekre tervezett próbák meredeksége látható.

<i>Gén</i>	<i>Festék</i>	<i>m</i>	<i>R²</i>
tirozin-hidroxiláz	VIC	-3,366	0,998
dopamin- β -hidroxiláz	FAM	-3,373	0,996
MAO-A	VIC	-3,278	0,996
dopamin transzporter	FAM	-3,461	0,997
COMT	VIC	-3,509	0,997
vazopresszin-receptor-1A	FAM	-3,273	0,998

9. táblázat: A génszám változások meghatározásához általunk tervezett próbák fontosabb jellemzői. *MAO-A* (monoamino-oxidáz A), *COMT* (katekolamin-O-metiltranszferáz); FAM és VIC: a próbák 5' végén levő riporter festékek; (elméleti meredekség = -3,322)

A génszám meghatározás során a vizsgált és az adott esetben referenciának választott gén hányadosát, azaz a célgén relatív mennyiségét határozzuk meg. Ennek matematikai kifejezője a két génre vonatkozó C_T -k különbsége, azaz az ún. ΔC_T érték. A kiértékelés során a génszámot az alábbi egyenlet szerint határoztuk meg:

$$\text{génszám} = 2^{C_{T(\text{kontroll})} - C_{T(\text{gén})} + 1} / q$$

$C_{T(\text{kontroll})}$: a kontroll génhez tartozó C_T érték, $C_{T(\text{gén})}$: vizsgált gén C_T értéke, q : arányosági hányados. A q arányosági hányados bevezetése és alkalmazása azért szükséges, mert a leg gondosabban optimalizált körülmények mellett sem valósítható meg, hogy az eltérő szekvenciájú ill. fluoreszcens riporter festékekkel jelölt próbák teljesen azonos hatékonysággal működjenek, így a ténylegesen 1 : 1 arány a nyers adatok alapján ettől eltérő értéknek (10. táblázat: $2^{-\Delta C_T}$) mutatkozik. A mért eredmények alapján azonban a q érték minden génpárra megállapítható, s így az adott gén kópiaszáma kiszámolható.

A vizsgálatba 20 egyedet vontunk be mindegyik fajtából (tervueren, groenendael, malinois, német juhászkutya, szibériai husky és európai farkas), így génenként összesen 80 kutyát és 20 farkast analizáltunk. A rendszerünk megbízhatóságát a *MAO-A* génre tervezett TaqMan rendszer segítségével is igazoltuk. Ez a gén az X kromoszómán helyezkedik el, így kan egyedek esetében génszámként 1-et, míg szuka kutyák esetében 2-t kellett kapjunk. Azokat a kísérleteket, ahol a megfelelő *MAO-A* génszámot nem sikerült megbízhatóan kimutatnunk, megismételtük.

minta	<i>TH</i>	<i>DBH</i>	<i>TH</i>	<i>DBH</i>	ΔC_T	<i>TH/DBH</i>	<i>génszám</i>
	C_T	C_T	átlag	átlag		$2^{-\Delta C_T}$	$2^{-\Delta C_T+1}/q$
K400A	29,31	28,17	29,26	28,07	1,18	0,44	1,94
	29,24	27,95					
	29,22	28,10					
K401A	28,05	26,95	28,05	26,94	1,10	0,47	2,05
	28,06	26,90					
	28,03	26,98					
K402A	29,10	28,14	29,29	28,11	1,18	0,44	1,94
	29,43	28,07					
	29,33	28,11					
K403A	28,77	27,54	28,76	27,66	1,10	0,47	2,05
	28,75	27,79					
	28,75	27,64					
K286A	27,10	26,22	27,34	26,17	1,17	0,44	1,95
	27,38	26,13					
	27,54	26,16					
K287A	26,64	25,85	26,83	25,76	1,07	0,48	2,09
	26,8	25,70					
	27,05	25,73					
K288A	29,24	28,02	29,22	28,07	1,15	0,45	1,98
	29,11	28,06					
	29,31	28,13					
K289A	28,97	27,71	28,93	27,73	1,20	0,44	1,91
	29,01	27,70					
	28,81	27,78					

10. táblázat: CNV analízis egy példája. Az ábrán 8 minta látható 2 génre (*TH*, *DBH*) vizsgálva. Minden mintából 3 párhuzamos mérés készült. A *DBH* gént használtuk kontrollnak.

A 10. táblázat alapján az eredmények kiértékelésének lényege követhető nyomon: 8 kutyára *DBH*-hoz viszonyított *TH* génszámának meghatározása látható. A Sequence Detection Software (Applied Biosystem) segítségével meghatározott C_T értéket egy Excel file-ba exportáltuk. Első lépésként kiszámoltuk a mért C_T -k átlagát, majd két átlagot egymásból kivonva megkaptuk a ΔC_T értéket. Abban az esetben, ha a két gén mérése egy csőben történt, akkor ezt a két matematikai lépést fölcseréltük, ekkor ugyanis célszerűbb az egyes csövekben megfigyelhető ΔC_T értékből kiindulni, és ezek átlagával tovább dolgozni. Mindkét megközelítés következő lépése a két gén hányadosának meghatározása ($2^{-\Delta C_T}$), ami a fenti megfontolások alapján a legtöbb esetben nem 1 körüli értéknek mutatkozik. A kiértékelés következő lépése a q arányossági hányados meghatározása, ami nem más, mint a nem kiugró $2^{-\Delta C_T}$ értékek átlaga. A sorból esetlegesen jelentősen kilógó (1,5 ill. 2-szer nagyobb vagy 2/3 ill. 1/2) értékeket azért kell kihagyni,

mivel éppen ezek felelnek meg a kettőtől eltérő génszámnak, tehát ezek nem vonhatók be az átlag számolásába, mivel ez éppen a számítás pontatlanságát eredményezné. A táblázatban lévő adatok alapján a q érték ebben az esetben 0,454 (mind a nyolc érték átlaga), melynek segítségével a két gén tényleges aránya, ill. ennek kétszeresként a *TH* génszám kiszámolható. A táblázatban bemutatott adatok alapján megfigyelhető, hogy a génszám ezen módszert alkalmazva megfelelő pontossággal meghatározható. (A „gén-szám” oszlopban természetesen a számolt, közelítő érték áll, a tényleges *TH* génszám mind a nyolc kutya esetében pontosan 2.)

A megvizsgált 20 fős csoportokban a tirozin-hidroxiláz, a dopamin- β -hidroxiláz, a dopamin-transzporter, a ketekolamin-*O*-metiltranszferáz és a vazopresszin-receptor 1a gének egyike esetében sem találtunk 2-től eltérő génszámot, ennek alapján elmondható, hogy a vizsgált kutya populációk genomjának ezen régióiban nem fordul elő CNV.

6 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

6.1 A DRD4 gén 3. exon VNTR polimorfizmus és viselkedésbeli asszociációja.

Kutatásunk kezdetén a *DRD4* 3. exon VNTR allél frekvenciáit 23 kutyafajtában már vizsgálták és összefüggésbe hozták viselkedésbeli különbségekkel.³⁴ A 23 kutyafajtát ezen polimorfizmus bizonyos alléljainak megléte illetve hiánya alapján két csoportra osztották. Az *A* csoportba tartozó kutyák főként a 2 és *3a* allélokat hordozták, míg a *3b*, az 5 és 6 allélok gyakrabban fordultak elő a *B* csoportba tartozó egyedekben. A fenotípust a kutyák gazdái által kitöltött kérdőív alapján állapították meg. Az eredmények azt mutatták, hogy a *B* csoportba sorolt kutyák magasabb pontértékeket értek el az „agresszivitás” jellemzésében és alacsonyabb pontot kaptak a „reaktivitásra” szemben az *A* csoportba tartozó egyedekkel, és ennek alapján felvetették, hogy a polimorfizmus esetlegesen szerepet játszhat a kutyák viselkedésének genetikai meghatározásában.

Munkánk során némileg más megközelítésben végeztük a *DRD4* VNTR asszociációvizsgálatát. A populáció stratifikációból adódó esetleges ál-pozitív összefüggések elkerülése céljából⁶⁵, csak egy kutyafajtát, a német juhászkutyát vizsgáltuk, szemben a fent említett, több fajtát együtt elemző megközelítéssel. Így tudtuk biztosítani a viszonylag homogén genetikai hátteret, mely nélkülözhetetlen egy kandidáns gén és annak fenotípusos hatása közötti asszociáció analízishez.

A dopamin D4-es receptor gén 3. exonban levő hosszúság polimorfizmus vizsgálatába több mint 200 magyarországi német juhászkutyát vontunk be. A mért genotípus frekvenciák megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak, ennek alapján feltételezhető, hogy a vizsgált populáció viszonylag független, nem rokon egyedekből állt. Eredményeink összhangban vannak Ito és munkacsoportja által közölt vizsgálattal, melyben ugyanezt a két allélt (2 és *3a* allél) találták a leggyakoribbnak az általuk vizsgált 25 német juhászkutyában.³⁴ Az általuk vizsgált egyedekben alacsony gyakorisággal két másik változat (a *3b* és az 5 allél) is előfordult, a mi tanulmányunkban részt vevő állatok ezeket a variánsokat nem hordozták. A magyar és a japán minta közötti különbség nagy valószínűséggel a földrajzi elszigeteltségből adódik.

A fenotípus karakterizálására az előzőleg már validált kutya-ADHD RS kérdőívet¹¹⁷ használtuk. A kérdőívek alkalmazása, mint indirekt viselkedést mérő módszerek, az emberi tanulmányokban elfogadottak, és egyre inkább alkalmazzák a kutyáknál is.¹²⁰ Kísérletünk, hogy az ADHD RS kérdőívet adaptáljuk a kutyák viselkedésére, azon a

feltevésen alapult, amely szerint az ember szociális környezete a kutya természetes közegül szolgál. Továbbá számos hasonlóság fedezhető fel a kutyák és gyermekek „viselkedése” között a saját szociális környezetükben. Ezért a kutya megfelelő modell lehet néhány emberi viselkedési jelleg, mint például a gyermekkori hiperaktivitás vizsgálatában. Eredményeinkből látható, hogy a kutya-ADHD RS aktivitás-impulzivitás skálája jól alkalmazható az aktivitás-impulzivitás tulajdonság jellemzésére kutyákban.

Eredményeink szignifikáns összefüggést mutattak a *DRD4* VNTR polimorfizmus és a rendőrutyák aktivitás-impulzivitás pontértékei között, azonban nem találtunk hasonló kapcsolatot a családi-kutyák körében. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a rendőrutyák homogénebb környezetben (azonos kiképzés, hasonló környezeti feltételek, hasonló stressz szint) élnek. Ezzel szemben a családi kutyák esetében a változó környezeti hatások –a gazda viselkedése, a kiképzés minősége stb. – feltételezhetően elfedik a *DRD4* polimorfizmus gyenge genetikai hatását.

Ezek az eredmények utalhatnak gén-környezet kölcsönhatásra, mely a viselkedésgenetikai vizsgálatok fontos része, mint azt korábbi humán tanulmányok is alátámasztják,¹²¹ a mi vizsgálatunk mintaszáma azonban nem volt elegendően magas ahhoz, hogy statisztikailag szignifikáns gén-környezet interakciót mutathassunk ki.

6.2 *DRD4* 2. intron VNTR analízise

A fent kapott eredmények után megvizsgáltuk a kutya *DRD4* génjében található egyéb polimorfizmusokat is. A *DRD4* 2. intronjában lévő variációról munkánk kezdetén egyetlen irodalmi adat állt rendelkezésünkre: Nara és mtsai. közleménye számol be az itt található 17 bp inzerció/deléción polimorfizmusról.³⁵ Munkájuk során 28 kutya- és 2 farkasfajtát analizáltak, ezek között szerepelt (bár alacsony mintaszámmal) az általunk is vizsgált német juhászkutya, a szibériai husky, valamint az európai farkas, belga juhászkutyákat azonban nem vizsgálták.

A 2. intronban elhelyezkedő VNTR (AB126590, AB126591) elemzése során a 29. pozícióban egy C/T SNP-t azonosítottak, mely a 17 bp delécióval szorosan kapcsolatos: a T allél mindig az inzercióval, a C pedig a delécióval együtt fordul elő.

Ugyanezen munkacsoport a két allélt SV40 promótert és luciferáz gént tartalmazó expressziós vektorba klónozták, és működésüket COS-7 (afrikai zöld majom vese sejtvoval) valamint SK-N-SH (humán neuroblastoma) sejtvoalakba transzfektálva vizsgálták.

A két allél génexpresszióra gyakorolt hatása között nem találtak szignifikáns különbséget.

Egyre több tanulmány szól a nem kódoló régiókban lévő polimorfizmusok esetleges funkcionális jelentőségéről. MacKenzie és Quinn kutatása a humán szerotonin transzporter 2. intronjában található VNTR funkcionális analízisét tűzte ki célul.¹¹⁸ *LacZ* riporter vektor rendszerbe klónozták be a különböző hosszúságú allélokat és a konstrukciókat transzgenikus egémbriókban vizsgálták. Kísérleteik arra utaltak, hogy ez az intron szakasz szerepet játszik a transzkripció szabályozásában.

Mindezen irodalmi adatokat figyelembe véve, valamint szem előtt tartva azt a megfigyelést, miszerint a kutya *DRD4* gén 2. intronjában nem csupán egy egyszerű delécióról, hanem a 17 bp szakasz kétszeres illetve háromszoros ismétlődéséről van szó, ígéretesnek találtuk a polimorfizmus funkcionális elemzését is. A különböző hosszúságú allélokat luciferáz riporter vektor rendszerbe vittük be. Kétféle vektort használtunk: a pGL3-Basic promóter nélküli vektort, mely alkalmas a beklónozott szakasz esetleges promóter jellegének vizsgálatára, illetve a pGL3-Control SV40 promótert tartalmazó vektort, mely a vizsgált szakasz esetleges silencer hatásáról ad információt.

A 11A. ábrán látható, hogy az SK-N-FI sejtvonalba történő transzfektáláskor mind a pGL3B-Q, mind a pGL3B-P konstruktum egyaránt megnövelte az „üres” pGL3-Basichez viszonyított aktivitást. Ebből arra következtethetünk, hogy az általunk bevitt intron szakasznak aktiváló hatása lehet. Nem találtunk a két allél között jelentős aktivitásbeli különbséget, ennek oka valószínűleg az, hogy ezek a nagyon rövid vizsgált szakaszok csak közepes erősségű promóter aktivitást mutatnak. Ugyanakkor a pGL3C-Q és a pGL3C-P konstruktumok aktivitása között szignifikáns eltérést tapasztaltunk. A hosszú allélt hordozó vektor lecsökkentette a luciferáz aktivitását, míg a rövid allélt tartalmazó szinte nem változtatta meg azt, az „üres” pGL3-C alapaktivitásához képest. Az „üres” pGL3-C eleve magas alapaktivitása miatt sajnos már csak korlátozottan elemezhető, hogy a rövid allélt hordozó konstruktum esetleg tovább növelné-e még az aktivitást, másrészt viszont a két allél hatása közötti különbség így jobban kimutatható.

A HeLa sejtvonalba történő transzfektálásnál hasonló eredményeket kaptunk, mint a fent említett SK-N-FI rendszerben, a kimutatott különbségek azonban itt nem voltak annyira markánsak. A pGL3-Basic vektorokba bevitt intron szakaszok szintén megemelték a luciferáz aktivitását az „üres” pGL3-B aktivitásához képest. A pGL3-Control

vektorba klónozott konstruktumoknál a hosszú allélt hordozó változat szintén lecsökkentette az aktivitást a rövid variánst tartalmazóval szemben. Ebben a kísérletben azonban az „üres” pGL3-C alapaktivitása az allélokat hordozókéhoz képest nem volt olyan magas, mint azt az SK-N-FI esetében tapasztaltuk.

A két sejtvonallal kapott eredmények közötti különbség azzal magyarázható, hogy az SK-N-FI egy idegi, a HeLa viszont epithelialis karcinóma eredetű sejtvonal. Míg az utóbbiban endogén DRD4 expresszió egyáltalán nem mutatható ki, addig az SK-N-FI nagy mennyiségű saját DRD4 mRNS-t ír át. Ez is arra utal, hogy a két sejtvonalban eltérő transzkripciós apparátus van jelen, ami különbözőképpen hat a promóter nélküli és az SV40 promótert tartalmazó konstruktumok átírására. Ugyanakkor célunk elsősorban a DRD4 intron 2 hosszú és rövid változatának összehasonlítása volt, mely erős promóter mellett mindkét sejtvonalban kimutatható volt.

Mindezekből arra következtethetünk, hogy a *DRD4* 2. intronban lévő VNTR-nek van valamiféle promóter jellegű tulajdonsága *in vitro* rendszerben, mint azt a pGL3-B vektor alapú konstruktumoknál láthattuk, illetve elképzelhető, hogy a VNTR régió szerepet játszhat a génextpresszió szabályozásában, de szövet specifikusan.

Az intron régiókban előforduló másodlagos promóterek létezése már ismert a humán tanulmányokból. Ilyen például a humán DRD4 gén, melyben kétféle (5,3 és 1,5 kb) méretű mRNS-t írtak le¹²², ami alapján feltételezhető, hogy alternatív start pont található a génben. Emellett a neurotranszmisszió másik génjében (COMT) is ismert már, hogy létezik másodlagos promóter szerű szekvencia intron régióban.¹²³

A DRD4 2. intron szekvenciájának *in silico* vizsgálata során a hosszú variánsban 6 db Sp1 konszenzus szekvenciát találtunk, míg a 17 bp deléciós variáns ebből a transzkripciós faktor kötőhelyből kettővel kevesebbet tartalmazott, melyek felelősek lehetnek az allélok közti különbségekért. Egy negatív transzkripciós faktort, a DRRF-et (dopamine receptor regulating factor) már kimutatták rágcsálók agyában, mely az Sp1 család tagja.¹²⁴ Megerősítést nyert az is, hogy a DRRF specifikusan kötődik az Sp1- és Sp3- konszenzus szekvenciákhoz a dopamin D1A és D2 receptor génjeiben.¹²⁵ Következtetésképpen és a saját eredményeinkkel összhangban elképzelhető, hogy esetleg a humán DRRF-hez hasonló transzkripciós faktor befolyásolhatja a kutya DRD4 gén expresszióját az 2. intron VNTR-en keresztül, emellett természetesen számos más faktor szerepe is nagy valószínűséggel jelentős.

6.3 További ismétlődési polimorfizmusok kiterjedt populáció vizsgálata a kutya dopaminerg rendszer génjeiben

A neurotranszmitter rendszer genetikai polimorfizmusai fontos szerepet játszhatnak számos viselkedési jelleg és pszichiátriai betegség kialakulásában. A polimorfizmusok mérete nagyon változatos, az egy pontos nukleotid kicserélődéstől (SNP) a több millió bázispárt érintő, már mikroszkóposan is látható kromoszómaváltozásig terjedhet.¹²⁶ Ezek a változatok jól használhatóak kapcsoltsági-¹²⁷ és genom szintű vizsgálatokban,¹²⁸ sőt ezeket a variánsokat funkcionálisan is vizsgálták, mind a kódoló¹²⁹, mind a nem kódoló^{24,119} régiókban. Az ismétlődési polimorfizmusoknak, mint például a mikroszatellitáknak, delécióknak, duplikációknak, VNTR-eknek gyakorlati és funkcionális szempontból is nagy jelentősége van. A teljes genom vizsgálatok során a mikroszatelliták vizsgálata az SNP-k elemzésénél bizonyos szempontból előnyösebb. Ez azzal magyarázható, hogy míg az SNP-k legtöbbször két alléllal rendelkeznek, azaz a diploid genomban a variációs lehetőségek száma 3, addig a mikroszatelliták esetében akár 15-20 allélvariáció is elterjedt lehet a populációban, ami a genotípus variációk számát 100 fölé emeli.¹³⁰ Az ismétlődési polimorfizmusok nagy részét asszociáció analízisekben is vizsgálták, és kimutatták esetleges funkcionális hatásukat is.¹³¹ A kódoló régióban lévő VNTR-ek vagy frameshiftet és ezáltal csonka (truncated) fehérjét (13 bp deléció a humán *DRD4* génben¹³²), vagy ismétlődő aminosav szekvenciát (humán és kutya *DRD4* exon 3 polimorfizmus) okozhatnak

Munkánk során számos új VNTR-t találtunk a kutya dopaminerg génjeiben, ezenkívül kiterjedten vizsgáltuk a már ismert polimorfizmusokat a *DRD4* génben (11. táblázat). Eredményeink azt mutatták, hogy a humán és kutya VNTR-ek között nagyfokú hasonlóság csak az exon polimorfizmusokban volt, az intron polimorfizmusok ezzel szemben jelentősen különböztek a humán és a kutya genomban (11. táblázat). Ez a megfigyelés feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a genom nem kódoló régióira kisebb szelekciós nyomás hat, így magasabb lehet a variabilitása az egyes fajok között.

Gének	humán		kutya / farkas		elhelyezkedés
	méret	allél	méret	allél	
<i>DRD4</i>	5' régió	120 bp	1-4	?	?
	1. exon	12 bp	1-2	24 bp	ins/del chr 18*
	3. exon	48 bp	2-10	39 bp	2-8 chr 18: 28722804-28723009
<i>DAT</i>	5. intron	–	–	59 bp	np
	8. intron	30 bp	2-4	–	–
	9. intron	–	–	38 bp	1-2 chr 34: 142 411 027–142 411 102
	3' régió	40 bp	9-11	–	–
<i>DBH</i>	4. intron	–	–	17 bp	1/3 chr 9: 53 348 625–53 348 675
	11. exon	–	–	24 bp	np
<i>TH</i>	4. intron	–	–	36 bp	1-2 chr 18: 49 355 111–49 355 075

11. táblázat: Ismétlődő szekvenciák és polimorfizmusok az ember és kutya dopaminerg rendszer génjeiben. Az allél oszlopban szereplő számok az ismétlődések számát jelentik; ?: szekvencia nem ismert; np: nem polimorf ismétlődés. Az ismétlődő egységek hossza a méret oszlopban olvasható. A polimorf VNTR-ek kromoszómális elhelyezkedését az Ensembl adatbázis alapján tüntettük fel. *: A *DRD4* gén teljes szekvenciája nem érhető el az Ensembl adatbázisban; a szekvenciát az NCBI adatbázisából töltöttük le, azonban a pontos kromoszómális lokalizáció itt nem található meg.

Ennek ellenére az intron szekvenciáknak szerepe lehet a génexpresszió szabályozásában, mint ahogy azt a szerotonin transzporter 2. intron esetében is leírták.¹⁰⁷ Az újonnan talált kutya ismétlődő régióknak funkcionális jelentősége szintén elképzelhető. A TFSEARCH adatbázis (Searching Transcription Factor Binding Sites ver 1.3; <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) segítségével a humán Sp1 transzkripció faktor kötő helyét azonosítottuk a tirozin-hidroxiláz 4. intron polimorfizmusában, és AML-1a transzkripció faktor kötőhelyet a *DBH* 4. intron VNTR-ben. További vizsgálatok szükségesek, hogy megállapítsuk a funkcionális jelentőségét a kutya dopaminerg génjeiben általunk azonosított nem exon polimorfizmusoknak.

Eredményeink azt mutatják, hogy az eltérő kutyafajták genetikai felépítése nagyban különbözik. Nagy eltérést találtunk még a belga juhászkutyafajtán belül is, a belga malinois és a másik két belga juhászkutya alcsoport között (8. táblázat, *TH* intron 4, *DAT* intron 9). Érdekes továbbá, hogy egyes kutyafajták között nagyobb genetikai különbség mutatható ki, mint amekkora más kutyafajták és a farkas közötti variabilitás. Ez a megfigyelés megegyezik Vila és mtsai. a mitokondriális DNS vizsgálatával kapott eredményeivel.⁵² Úgy vélték, hogy a kutyák és farkasok közötti genetikai különbségek

talán nem annyira jelentősek, mivel a két faj genetikai állománya a kb. 100000 évvel ezelőtti szétválásuk után is folyamatosan keveredett.

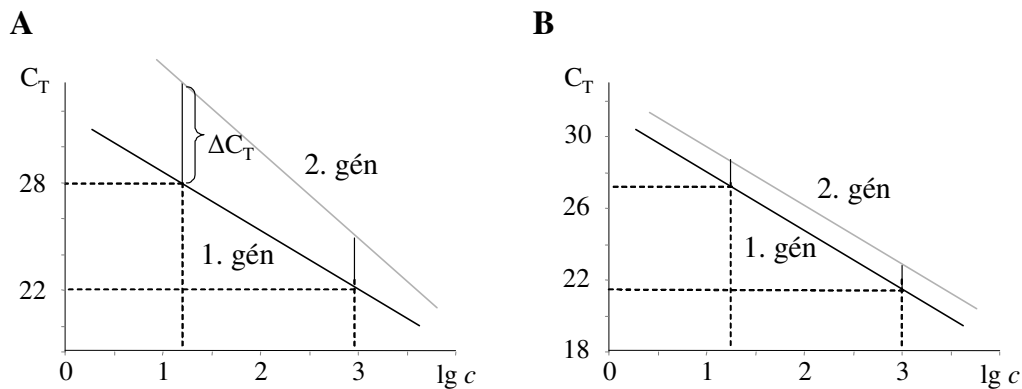
6.4 Gén kópiaszám polimorfizmusok vizsgálata a kutya dopaminerg és szerotonerg génjeiben

Néhány évvel ezelőtt új felfedezés történt a humán genom variabilitására vonatkozóan. Több tanulmány számolt be arról, hogy egészséges emberekben bizonyos gének eltérő számban vannak jelen (CNV).¹³³ Wigler munkacsoportja mindössze 20 személy vizsgálata során 221 ilyen variábilis helyet talált a genomban, és ezek közül 76 polimorfizmus bizonyult, azaz a ritka változat gyakorisága is meghaladta az 1%-ot.¹⁰⁸ Lee és Scherer 55 személyt vizsgált, és 255 számbeli variációt talált, melyből 102 sorolható a polimorfizmus kategóriába.¹³⁴ Ezen variációk az adott DNS szakasz delécióját, inzercióját, inverzióját, duplikációját jelenthetik.

Munkacsoportunk real-time PCR alapú módszert dolgozott ki a komplement rendszer két elemének, a C4A és C4B gének kópiaszámának meghatározására.¹¹⁰

Munkánk során ezen módszerhez hasonló technikát dolgoztunk ki a kutya mintákban esetlegesen előforduló gén kópiaszám változások meghatározására.

A qPCR-rel történő kvantitatív mérés elvi alapja, hogy a PCR kezdeti, exponenciális szakaszában a keletkező termék mennyisége arányos a kiindulási DNS-koncentrációval. A későbbiekben a reakció egyre kisebb hatásfokkal megy végbe, míg végül eléri a végső, ún. plató fázist. A PCR termék mennyiségének növekedésével arányosan nő az emitált fény intenzitása, így folyamatos detektálással nyomon követhető a reakció dinamikája. A kezdeti DNS koncentráció meghatározására egy olyan fluoreszcencia „küszöb” értéket választunk, amelyet minden reakció az exponenciális fázisban ér el. Így minden mintához hozzárendelhető egy küszöb-ciklusszám (C_T), melynek segítségével meghatározható a kiindulási DNS-templát abszolút mennyisége.



14. ábra: Hígítási sorozat. A-B: két képzeletbeli próba alkalmazása relatív kvantifikáláshoz. **A:** a két próbával készült hígítási sorozathoz tartozó egyenesek meredeksége eltérő: különböző kiindulási DNS koncentrációnál eltérő ΔC_T értéket kapunk, azaz a mérés eredménye a kiindulási DNS-koncentrációtól függ. **B:** A két egyenes párhuzamos (meredekségük egyezik): Bármilyen kiindulási DNS koncentrációnál ugyanakkora a ΔC_T értéke, azaz a két próba a relatív kvantifikálás során megbízhatóan alkalmazható.

A 14. ábra mutatja a hígítási sorok elemzésének jelentőségét a vizsgáló módszer optimalizálása során. A génszám meghatározás alapja lényegében az, hogy a vizsgált gén és a referencia hányadosát, azaz a célgén relatív mennyiségét határozzuk meg. Ennek matematikai kifejezője a két génre vonatkozó C_T -k különbsége, azaz az ún. ΔC_T érték. Az ábra A részén jól megfigyelhető, hogy ha a cél- és a kontroll gén mérésére alkalmazott TaqMan rendszer hatékonysága, azaz a két egyenes meredeksége jelentősen eltér egymástól, akkor különböző kiindulási koncentrációk mellett lényegesen eltérő ΔC_T értéket kapunk. A 14. ábra B része mutatja azt az ideális esetet, amikor – ezzel szemben – a két egyenes meredeksége teljesen megegyezik, ilyenkor a génszám bármilyen DNS-minta koncentráció mellett megbízhatóan meghatározható.

Az eredmények kiértékelése során a ΔC_T módszert alkalmaztuk, ennek segítségével számoltuk ki a vizsgált gének kópiaszámát. Az „Eredmények” fejezetben bemutatott egyenletben szerepel egy arányossági hányados (q). Ezen arányossági hányados alkalmazása azért szükséges, mert még abban az esetben sem kapunk 1:1 célgén/kontroll arányt, ha a fent említett egyenesek meredeksége megfelelő egyezést mutat. Ennek oka többek között az, hogy – amint az a 9. táblázatban látható – a próbák fele FAM, másik fele pedig VIC fluoreszcens festékkel jelölt. Ezzel a megoldással ugyanis a rendszer multiplexálható, mivel a FAM- és VIC-próbák egyszerre egy csőben alkalmazhatók. Ez nem csak a rendszer hatékonyságát, hanem a mérés megbízhatóságát is növeli, mivel a

pipettázási hibából adódó esetleges hibák (pl. templát DNS pontatlan bemérése) kiküszöbölődnek.

Méréseink során nem sikerült CNV-t kimutatnunk a vizsgált egyedek dopaminerg és szerotonerg génjeiben. Ennek lehetséges okai közé tartozhat, hogy fajtánként csak kevés egyedet tudtunk bevonni a vizsgálatba, annak magas költségei miatt. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a kutyákban nincs gén kópiaszám változás, hiszen az a 20 egyed / fajta nem ad releváns képet a teljes populációról.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A monoaminerg rendszer génjei fontos szerepet játszanak a személyiségjegyek és bizonyos komplex öröklődésű kórképek kialakításában, így mind a pszichológiai-, mind a pszichiátriai rendellenességek genetikai hátterének egyik leggyakrabban vizsgált célpontjai. Munkacsoportunk már évek óta foglalkozik ez egyik ilyen célgénnel, a humán dopamin D4-es receptor génjével. A viselkedés-genetikai kutatásokban egyre inkább elterjed az állatmodellek alkalmazása is. Jelen tanulmányban mi a kutyát választottuk modell állatnak. A faj kiválasztása során az egyik fontos kritérium az volt, hogy a humán *DRD4* 3. exonban található VNTR-hez hasonló hosszúság polimorfizmus ebben a fajban megtalálható, rágcsálókban ezzel szemben nem fordul elő.

Munkánk során összefüggést kerestünk a kutya *DRD4* génje és az ADHD (figyelemhiányos hiperaktivitási zavar) bizonyos elemei között, mivel a szakirodalom szerint a humán *DRD4* gén az ADHD egyik kandidáns génje. Szignifikáns asszociációt ($p = 0,018$) találtunk a kutya-ADHD kérdőív aktivitás-impulzivitás skálája és a *DRD4* VNTR között a 2/2 genotípusú rendőr német juhászkutyákban. Hasonló asszociációt a családi kutyák körében nem tudtunk kimutatni, ami azzal magyarázható, hogy a rendőr kutyák homogénebb környezetben élnek, így náluk feltételezhetően jobban érvényesülnek a genetikai különbségek. A *DRD4* 3. exon VNTR-ben egy új allélt azonosítottunk, mely nagy gyakorisággal fordul elő a szibériai huskyban és az európai szürke farkasban.

A *DRD4* 2. intron polimorfizmusáról megállapítottuk, hogy egy 17 bp-os szakasz variábilis ismétlődésének tekinthető, a polimorfizmust funkcionálisan aktívnak, promóter jellegűnek találtuk luciferáz riporter vektor rendszerben.

Számos korábban még nem azonosított polimorfizmust találtunk a kutya tirozin-hidroxiláz, dopamin- β -hidroxiláz és dopamin-transzporter génjeiben, és szignifikáns különbséget tapasztaltunk a vizsgálatba bevont öt kutyafajta ($N = 637$) allél- és genotípus gyakoriság értékei között. Az új polimorfizmusok további asszociáció és funkcionális vizsgálatok célpontjai lehetnek.

A kutya dopamineg és szerotonerg génjeiben esetlegesen fellelhető gén kópiaszám változások meghatározására qPCR-en alapuló módszert állítottunk be. Kísérleteink alátámasztották a kidolgozott technika megbízhatóságát, ugyanakkor a vizsgált régiókban CNV variációt nem sikerült azonosítanunk.

8 SUMMARY

Polymorphic variants in the genes of the monoaminergic neurotransmitter system were demonstrated to play a significant role in the development of personality traits and complex psychological as well as psychiatric disorders. Our group has been studying one of the most thoroughly investigated genes, the gene of the dopamine D4 receptor for more than a decade. Application of animal models is an alternative approach in the field of the research of behavioral genetics. Dogs were used in our study because of the interesting fact, that canines possess a variable number of tandem repeats polymorphism similar to that of humans, whereas neither rats, nor mice have an analogue sequence variation in the appropriate gene segment.

One of the major aims of our work was the study of any putative association between the dog *DRD4* exon III VNTR and some endophenotypes of the ADHD (attention deficit hyperactivity disorder), because it was suggested that this gene is a candidate of the disease in human. Significant association was demonstrated between the activity-impulsivity scale of the dog ADHD rating scale and the 2/2 genotype of the *DRD4* VNTR in police German Shepherds. In contrast, no similar association could be found in pet dogs, which might be explained by the fact, that police dogs live in a fairly homogeneous environment, consequently the genetic factors can play a larger role in the development of the phenotype. A novel variant (allele 8) of the *DRD4* VNTR was also identified and shown to be quite common among Siberian huskies and European gray wolves.

It was demonstrated that the previously described 17 bp deletion in intron 2 of the *DRD4* gene can also be considered as a VNTR polymorphism. Moreover, it was also shown, that the region possess a promoter activity in *in vitro* luciferase reporter system, consequently might play a role in the regulation of gene expression.

Further repeat polymorphisms were searched *in silico* and *in vitro* in the dopaminergic system (i.e. in the gene of the tyrosine hydroxylase, dopamine- β -hydroxylase and dopamine transporter), and it was observed, that allele- and genotype frequencies differed significantly among the five investigated dog breeds. These novel polymorphisms can be important targets of further functional and association studies.

A real-time PCR based method was elaborated for the analysis of copy number of genes in the dopaminergic and serotonergic system. Although the experiments proved the reliability of the novel approaches, no CNVs were detected in the investigated regions.

9 MELLÉKLET

ADHD becslő skála gazda változata

Kérjük jelölje be azt a választ, amely kutyája viselkedésére leginkább jellemző!

Gazda neve:

Kutya neve és neme:

Kutya születési ideje (év, hónap):

Kutya fajtája:

Dátum:

<i>Kérdések</i>	<i>Soha</i>	<i>Ritkán</i>	<i>Gyakran</i>	<i>Nagyon Gyakran</i>
1. Kutyája nehezen tanul, mert figyelmetlen, illetve könnyen elvonják a figyelmét más dolgok.	0	1	2	3
2. Könnyű a figyelmét felkelteni, de hamar elveszti az érdeklődését.	0	1	2	3
3. Nehezen tud koncentrálni a feladatra vagy a játéokra.	0	1	2	3
4. Elhagyja a helyét, amikor maradnia kellene.	0	1	2	3
5. Nem tud csendben maradni, nem lehet könnyen elhallgattatni.	0	1	2	3
6. Állandóan izeg-mozog, folyton menne, olyan, mintha felhúzták volna.	0	1	2	3
7. Úgy tűnik, nem figyel, akkor sem ha tudja, hogy hozzá beszélnek.	0	1	2	3
8. Szertelen, nehezen fegyelmezhető, ha egyszer beindul, alig lehet leállítani.	0	1	2	3
9. Folyton csak játszana, rohangálna.	0	1	2	3
10. Egyszerű feladatokat akár könnyen megold, de a bonyolultabbakkal rendszeresen nehézségei vannak, akkor is, ha ismeri és sokat gyakorolta őket.	0	1	2	3
11. Hajlamos elkapkodni a dolgokat és ezért hibázik a feladatokban.	0	1	2	3
12. Figyelme könnyen elvonható.	0	1	2	3
13. Nem tud várni a sorára.	0	1	2	3

Kutya képzési adatai:

(Kérjük jelezze, ha a kutya kiképzésben részesült vagy vizsgát tett.)

engedelmesség

őrző-védő

agility

vadászat

otthoni kiképzés

nem részesült kiképzésben

egyéb:

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Prof. Dr. Erdei Annának a Biológia Doktori Iskola és Prof. Dr. Gráf Lászlónak, a Szerkezeti Biokémia doktori program vezetőjének, hogy a doktori képzésben részt vehettem,

Prof. Dr. Mandl Józsefnek, hogy Ph.D. hallgatóként kutatómunkámat a Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézetében végezhettem,

Prof. Dr. Sasvári Máriának, a laboratórium vezetőjének, aki mind elméleti, mind gyakorlati téren maximális segítséget nyújtott, ötleteivel mindvégig segítette munkámat,

Dr. Rónai Zsoltnak, témavezetőmnek, a rendkívüli türelméért, amellyel megtanított a PCR metodikák rejtjelmeire, szakmai tudásáért és irányításáért, nem szűnő lelkesedéséért, mely átsegített az akadályokon és nem utolsó sorban kedvességéért,

Dr. Kereszturi Évának a vektorkészítés és a sejtes munkákban nyújtott segítségéért és mérhetetlen türelméért, bátorításáért, barátságáért,

Dr. Nemoda Zsófiának értékes tanácsaiért, barátságáért, humoráért,

Dr. Barta Csabának szakmai segítségéért, a jó hangulatért,

Dr. Miklósi Ádámnak és Dr. Vas Juditnak, valamint az ELTE Etológia Tanszék többi munkatársának, a fenotípus felvételéért, kiértékeléséért, a DNS-minták gyűjtéséért és a statisztikai analíziséért,

A laboratórium összes munkatársának a munkában való együttműködéséért, kedvességükért és a jó hangulatért.

11 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat anyagát képező publikációk:

- I. **Hejjas K**, Vas J, Topal J, Szantai E, Ronai Z, Szekely A, Kubinyi E, Horvath Z, Sasvari-Szekely M, Miklosi A. Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Anim Genet.* 2007 Dec;38(6):629-33. (IF.: 1,52)
- II. **Hejjas K**, Vas J, Kubinyi E, Sasvari-Szekely M, Miklosi A, Ronai Z. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. *Mamm Genome.* 2007 Dec;18(12):871-9. (IF.: 2,279)

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk:

- III. **Hejjas K**, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, Schilling B, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 Gene: A dimensional approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Jun 9. *elfogadva* (IF.: 4,463)

12 IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Topál, J., Miklósi, Á., Csányi, V. Dog-human relationship affects problem solving behavior in the dog. *Anthrozoös*. 1997;10, 214-224.
- 2 Topál, J., Gácsi, M., Miklósi, Á., Virányi, Zs., Kubinyi, E., Csányi, V. The effect of domestication and socialization on attachment to human: a comparative study on hand reared wolves and differently socialized dog puppies. *Anim. Behav.* 2005. 70, 1367–1375.
- 3 Frank, H., Frank, M.G. On the effects of domestication on canine social development and behaviour. *Appl. Anim. Ethol.* 1982;8, 507–525.
- 4 Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11):561-6.
- 5 *Encyclopedia of Genetics*. Editors: Brenner S, Miller (2002) JH, Orlando, US
- 6 Nielsen C, Hansen D, Husdy S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2003 Dec;62(6):492-7.
- 7 Wu SJ, Chiang FT, Chen WJ, Liu PH, Hsu KL, Hwang JJ, Lai LP, Lin JL, Tseng CD, Tseng YZ. Three single-nucleotide polymorphisms of the angiotensinogen gene and susceptibility to hypertension: single locus genotype versus haplotype analysis. *Physiol Genomics*. 2004 Apr 13;17(2):79-86.
- 8 Xing QH, Wu SN, Lin ZG, Li HF, Yang JD, Feng GY, Wang MT, Yang WW, He L. Association analysis of polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor gene in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003 Dec 1;65(1):9-14.
- 9 A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct;437, 1299-1320.
- 10 Nakamura Y, Koyama K, Matsusima M. VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. *J Hum Genet.* 1998;43(3):149-52.
- 11 Wolff R, Nakamura Y, Odelberg S, Shiang R, White R. Generation of variability at VNTR loci in human DNA. *EXS*. 1992;58:20-38.
- 12 Monsma FJ, Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR. Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad U S A.* 1990 Sep;87(17):6723-7.
- 13 Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):189-225.
- 14 Cichon S, Nöthen MM, Wolf HK, Propping P. Lack of imprinting of the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *Am J Med Genet.* 1996 Apr 9;67(2):229-31.
- 15 Nothen NM, Cichon S, Hemmer S, Hebebrand J, Remschmidt H, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt M, Catalano M, Fimmers R. Human dopamine D4 receptor gene: Frequent

- occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec;3(12):2207-12.
- 16 Catalano M, Nobile M, Novelli E, Nothen NM, Smeraldi E. Distribution of a novel mutation in the first exon of the human dopamine D4 receptor gene in psychotic patients. *Biol Psychiatry.* 1993 Oct 1;34(7):459-64.
- 17 Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature.* 1992 Jul 9;358(6382):149-52.
- 18 Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet.* 1996 Jul;98(1):91-101.
- 19 Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):309-14.
- 20 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 Sep;65(3):1157-65.
- 21 Van Tol HH. Structural and functional characteristics of the dopamine D4 receptor. *Adv Pharmacol.* 1998;42:486-90.
- 22 Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. Association between the 120-bp duplication of the dopamine D4 receptor gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Genetic and molecular analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Mar 5;144(2):231-6.
- 23 Seaman MI, Fisher JB, Chang FM, Kidd KK. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). *Am J Med Genet.* 1999 Dec 15;88(6):705-9.
- 24 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 May 10;258(2):292-5.
- 25 Ronai Z, Barta C, Guttman A, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. Genotyping the -521 C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *Electrophoresis.* 2001 Apr;22(6):1102-5.
- 26 Mitsuyasu H, Ozawa H, Takeda Y, Fukumaki Y. Novel polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *J Hum Genet.* 1999 Jun 23;44:416-8.
- 27 Bookman EB, Taylor RE, Adams-Campbell L, Kittles RA. DRD4 promoter SNPs and gender effects on extraversion in African Americans. *Mol Psychiatry.* 2002;7(7):786-9.

- 28 Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A, Sasvari-Szekely M. A novel A/G SNP in the –615th position of the dopamine D4 receptor promoter region as a source of misgenotyping of the –616 C/G SNP. *Am J Med Genet.* 2004 Apr 1;126B(1):74-8.
- 29 Szantai E, Szmola R, Sasvari-Szekely M, Guttman A, Ronai Z. The polymorphic nature of the human dopamine D4 receptor gene: a comparative analysis of known variants and a novel 27 bp deletion in the promoter region. *BMC Genet.* 2005 Jun 28;6(1):39.
- 30 Momozawa Y., Takeuchi Y., Kusunose R., Kikusui T. & Mori Y. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mammalian Genome.* 2005;16, 538–44.
- 31 Livak K.J., Rogers J. & Lichter J.B. Variability of dopamine D4 receptor (DRD4) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92, 427–31.
- 32 Niimi Y., Inoue-Murayama M., Murayama Y., Ito S. & Iwasaki T. Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden retriever and Shiba. *Journal of Veterinary Medical Sciences.* 1999;61, 1281–6.
- 33 O'Malley K.L., Harmon S., Tang L. & Todd R.D. The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure and demonstration of expression in the cardiovascular system. *The New Biologist.* 1992;4, 137–46.
- 34 Ito, H., Nara, H., Inoue-Murayama, M., Shimada, M. K., Koshimura, A., Ueda, Y., Kitagawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Murayama, Y., Morita, M., Iwasaki, T., Ôta, K., Tanabe, Y., Ito, S. Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *Journal of Veterinary Medical Sciences.* 2004;66, 815–20.
- 35 Nara, H., Inoue-Murayama, M., Koshimura, A., Sugiyama, A., Murayama, Y., Maejima, M., Ueda, Y., Ito, H., Randi, E., Kim HeuiSoo, Ha JiHong, Kitagawa, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Iwasaki, T., Morita, M., Ôta, K., Ito, S. Novel polymorphism of the canine dopamine receptor D4 gene intron II region. *Animal Science Journal.* 2005;76, 81-86.
- 36 Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S., Merrill, C.R. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucl. Acid Res.* 1991;19, 3753.
- 37 Wei, J., Ramchand, C.N., Hemmings, G.P. Possible association of catecholamine turnover with the polymorphic (TCAT)_n repeat in the first intron of the human tyrosine hydroxylase gene. *Life Sci.* 1997;61, 1341–1347.
- 38 Meloni R, Laurent C, Campion D, Ben Hadjali B, Thibaut F, Dollfus S, et al. A rare allele of microsatellite located in the tyrosine hydroxylase gene found in schizophrenic patients. *CR Acad. Sci.* 1995;318: 803–809.
- 39 Kobayashi K, Kaneda N, Ichinose H, Kishi F, Nakazawa A, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T. Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single accounts for generation of four mRNA types. *J. Biochem.* 1988;130: 907–912.

- 40 Jönsson E, Sedvall G, Brene S, Gustavsson P, Geijer T, Terenius L, et al. Dopamine-related genes and their relationship to monoamine metabolites in CSF. *Biol. Psychiatry*. 1996;40: 1032–1043.
- 41 Wei J, Ramchand CN, Hemmings GP. Association of polymorphic VNTR region in the first intron of the human TH gene with disturbances of the catecholamine pathway in schizophrenia. *Psychiatr. Genet*. 1995;5: 83–88.
- 42 Takeuchi Y, Hashizume C, Chon EM, Momozawa Y, Masuda K, Kikusui T, Mori Y. Canine tyrosine hydroxylase (TH) gene and dopamine beta -hydroxylase (DBH) gene: their sequences, genetic polymorphisms, and diversities among five different dog breeds. *J. Vet. Med. Sci*. 2005 Sep;67(9):861-7.
- 43 Köhnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, Kolb W, Gaertner I, Buchkremer G, Vonthein R, Schick S, Lutz U, Köhnke AM, Cubells JF. A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: Evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol. Psychiatry*. 2002;52:1151–1158.
- 44 Tang Y, Anderson GM, Zabetian CP, Köhnke MD, Cubells JF. Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH(-1603C/T) with plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2005;139: 88–90.
- 45 Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry*. 2005;57(11):1397–1409.
- 46 Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics*. 1992;14, 1104–1106.
- 47 Mitchell RJ, Howlett S, Earl L, White NG, McComb J, Schanfield MS, Briceno I, Papiha SS, Osipova L, Livshits G, Leonard WR, Crawford MH. Distribution of the 3' VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene in world populations. *Hum. Biol*. 2000;72(2):295–304.
- 48 Greenwood TA, Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics*. 2003 Nov;82(5):511-20.
- 49 Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Afsharinejad Z, Costa LG. Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Sep;15(9):659-68.
- 50 Musil, R. Evidence for the Domestication of Wolves in Central European Magdalenian Sites. in: S.J. Crockford, S.J. (Ed.) *Dogs Through Time: An Archeological Perspective*. Victoria B.C., Canada: BAR International Series. 2000;889. pp. 21-28.
- 51 Sablin, M.V., Khlopachev, G.A. The Earliest Ice Age Dogs: Evidence from Eliseevichi I. *Curr. Anthropol*. 2002;43, 795-799.

- 52 Vilà, C., Maldonado, J.E., Amorim, I.R., Rice, J.E., Honecutt, R.L., Crandall, K.A., Lundeberg, J., Wayne, R.K. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science*. 1997;276, 1687-1689.
- 53 Savolainen, P. mtDNA Studies of the origin of dogs. In: Ostrander, E, A, Giger, U, Lindbladh, K, ed. *The dog and its genome*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2006;pp. 119-140.
- 54 Ostrander, E.A., Galibert, F., Patterson, D.F., 2000. Canine genetics comes of age. *TIG*. 16, 117-124.
- 55 Miklósi, Á., Topál, J., Csányi, V. Comparative social cognition: what can dogs teach us? *Anim. Behav.* 2004;67, 995–1004.
- 56 Topál, J., Miklósi, Á., Csányi, V., Dóka, A. Attachment Behaviour in Dogs (*Canis familiaris*): a New Application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test. *J. Comp. Psychol.* 1998;112, 219-229.
- 57 Gácsi, M., Topál, J., Miklósi, A., Dóka, A., Csányi, V., 2001. Attachment Behaviour of Adult Dogs (*Canis familiaris*) Living at Rescue Centers: Forming New Bonds. *J. Comp. Psychol.* 2001;115, 423-431.
- 58 Naderi, Sz., Miklósi, Á., Dóka, A., Csányi, V. Co-operative interactions between blind persons and their dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2001;74, 59-80.
- 59 Biederman, J. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. *Biol. Psychiatry*. 2005;57, 1215-1220.
- 60 Head, E., Callahan, H., Cummings, B.J., Cotman, C.W., Ruehi, W.W., Muggenberg, B.A. and Milgram, N.W. Open Field Activity and Human Interaction as a Function of Age and Breed in Dogs. *Physiology & Behavior*. 1997;62, 963-971.
- 61 Drolet, G., Proulx, K., Pearson, D., Rochford, J., Deschepper, C.F. Comparisons of behavioral and neurochemical characteristics between WKY, WKHA, and Wistar rat strains. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27, 400-409.
- 62 Sagvolden, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000;24, 31-39.
- 63 Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry*. 2001 Mar;6(2):143-9.
- 64 Owen MJ, Holmans P, McGuffin P. Association studies in psychiatric genetics. *Mol Psychiatry*. 1997 Jul;2(4):270-3.
- 65 Hamer D, Sirota L. Beware the chopsticks gene. *Mol Psychiatry*. 2000 Jan;5(1):11-3.
- 66 Devlin B, Roeder K. Genomic controll for association studies. *Biomertics*. 1999 Dec;55(4):997-1004.

- 67 Schulze TG, McMahon FJ. Genetic association mapping at the crossroads: Which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet.* 2002 Jan 8;114(1):1-11.
- 68 Holmes J, Payton A, Barrett J, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Worthington J, Gill M, Kirley A, Hawi Z, Fitzgerald M, Asherson P, Curran S, Mill J, Gould A, Taylor E, Kent L, Craddock N, Thapar A. Association of DRD4 in children with ADHD and comorbid conduct problems. *Am J Med Genet.* 2002 Mar 8;114(2):150-3.
- 69 Gornick MC, Addington A, Shaw P, Bobb AJ, Sharp W, Greenstein D, Arepalli S, Castellanos FX, Rapoport JL. Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene 7-repeat allele with children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): an update. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Apr 5;144(3):379-82.
- 70 Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett E R, Nemanov L, Katz M, Belmaker R: DopaminD4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nature Genetics* 1996(1):78-80.
- 71 Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 2001 Jul;158(7):1052-7.
- 72 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 Sep;5(5):531-6.
- 73 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.* 2001 Jan 8;105(1):84-90.
- 74 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 Jan;5(1):64-9.
- 75 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 Jan;6(1):35-8.
- 76 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 Nov;6(6):618-9.
- 77 Strobel A, Lesch KP, Hohenberger K, Jatzke S, Gutzeit 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.
- 78 Persson, M.L., Wasserman, D., Jonsson, E.G., Bergman, H., Terenius, L., Gyllander, A., Neiman, J., Geijer, T., 2000. Search for the influence of the tyrosine hydroxylase (TCAT)*n* repeat polymorphism on personality traits. *Psychiatry Res.* 95, 1–8.

-
- 79 Tochigi M, Otowa T, Hibino H, Kato C, Otani T, Umekage T, Utsumi T, Kato N, Sasaki T. Combined analysis of association between personality traits and three functional polymorphisms in the tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase A, and catechol-O-methyltransferase genes. *Neurosci Res.* 2006 Mar;54(3):180-5.
- 80 Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Iyo M, Tateno Y, Toru M. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature.* 1997;385: 634–636
- 81 Burgert E, Crocq MA, Bausch E, Macher JP, Morris-Rosental DJ. No association between the tyrosine hydroxylase microsatellite marker HUMTH01 and schizophrenia or bipolar I disorder. *Psychiatr Genet.* 1998;8: 45–48
- 82 Jönsson EG, Geijer T, Gyllander A, Terenius L, Sedvall GC. Failure to replicate an association between a rare allele of a tyrosine hydroxylase gene microsatellite and schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;248: 61–63
- 83 Kurumaji A, Kuroda T, Yamada K, Yoshikawa T, Toru M. An association of the polymorphic repeat of tetranucleotide (TCAT) in the first intron of the human tyrosine hydroxylase gene with schizophrenia in a Japanese sample. *J Neural Transm.* 2001;108(4):489-95.
- 84 Ishiguro H, Arinami T, Saito T, Akazawa S, Enomoto M, Mitsushio H, Fujishiro H, Tada K, Akimoto Y, Mifune H, Shiozuka S, Hamaguchi H, Toru M, Shibuya H. Systematic search for variations in the tyrosine hydroxylase gene and their associations with schizophrenia, affective disorders, and alcoholism. *Am J Med Genet.* 1998;81: 388–396
- 85 Bellivier F, Schürhoff F, Nosten-Bertrand M, Mallet J, Feingold J, Leboyer M. Methodological problem in meta-analysis of association studies between affective disorders and the tyrosine hydroxylase gene. *Am J Med Genet.* 1998;81: 349–350
- 86 Cauli G, Macciardi F, Verga M, Franchini L, Cavallini C, Serretti A, Surace S, Smeraldi E. TH and D4 as candidate genes for bipolar disorder (abstract). *Psychiatr Genet.* 1995; 5(suppl. 1):S94.
- 87 Serretti A, Macciardi F, Verga M, Cusin C, Pedrini S, Smeraldi E. Tyrosine hydroxylase gene associated with depressive symptomatology in mood disorder. *Am J Med Genet.* 1998 Mar 28;81(2):127-30.
- 88 Comings DE, Wu S, Chiu C, Ring RH, Gade R, Ahn C, MacMurray JP, Dietz G, Muhleman D. Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: the additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes—DRD2, D beta H, and DAT1. *Am J Med Genet.* 1996;67:264 –288.
- 89 Wigg K, Zai G, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Barr CL. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine beta hydroxylase. *Am J Psychiatry.* 2002;159:1046 –1048.
- 90 Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Navia BA. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder.
-

- der: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet.* 2003;119B:77–85.
- 91 Inkster B, Muglia P, Jain U, Kennedy JL. Linkage disequilibrium analysis of the dopamine beta-hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet.* 2004;14:117–120.
- 92 Tang Y, Buxbaum SG, Waldman I, Anderson GM, Zabetian CP, Köhnke MD, Cubells JF. A single nucleotide polymorphism at DBH, possibly associated with attention-deficit/hyperactivity disorder, associates with lower plasma dopamine beta-hydroxylase activity and is in linkage disequilibrium with two putative functional single nucleotide polymorphisms. *Biol Psychiatry.* 2006 Nov 15;60(10):1034-8.
- 93 Cubells JF, Zabetian CP. Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: Applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl).* 2004;174:463–476.
- 94 Togsverd M, Werge TM, Tankó LB, Bagger YZ, Hansen T, Qin G, Christiansen C, Rasmussen HB. Association of a dopamine beta-hydroxylase gene variant with depression in elderly women possibly reflecting noradrenergic dysfunction. *J Affect Disord.* 2008 Feb;106(1-2):169-72.
- 95 Muramatsu, T. and Higuchi, S. Dopamine transporter gene polymorphism and alcoholism. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1995;211, 28–32.
- 96 Sander T, Harms H, Podschus J, Finckh U, Nickel B, Rolfs A, Rommelspacher H, Schmidt LG. Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium. *Biological Psychiatry.* 1997;41, 299–304.
- 97 Schmidt LG, Harms H, Kuhn S, Rommelspacher H, Sander T. Modification of alcohol withdrawal by the A9 allele of the dopamine transporter gene. *American Journal of Psychiatry.* 1998;155, 474–478.
- 98 Gorwood P, Limosin F, Batel P, Hamon M, Adès J, Boni C. The A9 allele of the dopamine transporter gene is associated with delirium tremens and alcohol-withdrawal seizure. *Biological Psychiatry.* 2003;53, 85–92.
- 99 Franke P, Schwab SG, Knapp M, Gänsicke M, Delmo C, Zill P, Trixler M, Lichtermann D, Hallmayer J, Wildenauer DB, Maier W. (1999) DAT1 gene polymorphism in alcoholism: a family-based association study. *Biological Psychiatry.* 1999;45, 652–654.
- 100 Foley PF, Loh EW, Innes DJ, Williams SM, Tannenberg AE, Harper CG, Dodd PR. Association studies of neurotransmitter gene polymorphisms in alcoholic Caucasians. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1025, 39–46.
- 101 Limosin F, Loze JY, Boni C, Fedeli LP, Hamon M, Rouillon F, Adès J, Gorwood P. The A9 allele of the dopamine transporter gene increases the risk of visual hallucinations during alcohol withdrawal in alcohol-dependent women. *Neuroscience Letters.* 2004;362, 91–94.

- 102 Köhnke MD, Batra A, Kolb W, Köhnke AM, Lutz U, Schick S, Gaertner I. Association of the dopamine transporter gene with alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 2005 Sep-Oct;40(5):339-42.
- 103 Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnoila M, Weinberger DR. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22, 133–139.
- 104 Hart, B. L. and Hart, L. A. Selecting pet dogs on the basis of cluster analysis of breed behavior profiles and gender. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985;186: 1181–1185.
- 105 Phillips J, Calos MP. Transfection of DNA into mammalian cells in culture. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. 2001 <http://www.els.net/>
- 106 Gromov PS, Celis JE. Gene transfer and expression in tissue culture cells. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group. 2001 <http://www.els.net/>
- 107 Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 1999;458(2):171–174
- 108 Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004 Jul 23;305(5683):525-8.
- 109 Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*. 2005 Mar 4;307(5714):1434-40.
- 110 Agnes Szilagyí, Bernadett Blaskó, Denes Szilassy, George Fust, Maria Sasvari-Szekely and Zsolt Ronai. Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes. *BMC Genetics*. 2006, 7:1 doi:10.1186/1471-2156-7-1
- 111 Warren RP, Singh VK, Cole P, Odell JD, Pingree CB, Warren WL, DeWitt CW, McCullough M. Possible association of the extended MHC haplotype B44-SC30-DR4 with autism. *Immunogenetics*. 1992;36:203-207.
- 112 Matsuki K, Juji T, Tokunaga K, Naohara T, Satake M, Honda Y. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype frequencies estimated from the data on HLA class I, II, and III antigens in 111 Japanese narcoleptics. *J Clin Invest*. 1985;76:2078-2083.
- 113 Egan CM, Sridhar S, Wigler M, Hall IM. Recurrent DNA copy number variation in the laboratory mouse. *Nat Genet*. 2007 Nov;39(11):1384-9.
- 114 Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 15;27(2):573-80.

- 115 Ronai Z, Guttman A, Nemoda Z, Staub M, Kalasz H, Sasvari-Szekely M. Rapid and sensitive genotyping of dopamine D4 receptor tandem repeats by automated ultrathin-layer gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000;21(10): 2058-2061.
- 116 DuPaul G.J. *ADHD Rating Scale-IV: Checklist, Norms and Clinical Interpretations*. Guilford Press, New York. 1998.
- 117 Vas J, Topal J, Pech E, & Miklosi A. Measuring attention deficit and activity in dogs: A new application and validation of a human ADHD questionnaire. *Applied Animal Behavior Science*. 2007;103, 105–17.
- 118 MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15251-5.
- 119 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 May 24;7:18.
- 120 Hsu Y. & Serpell J. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2003;223, 1293–300.
- 121 Caspi A. & Moffitt T.E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nature Reviews*. 2006;7, 583–90.
- 122 Todd & O'Malley. The dopamine receptor DRD4 gene: are duplications distracting? *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Feb;22(2):55-6.
- 123 Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem*. 1994 Aug 1;223(3):1049-59.
- 124 Hwang CK, D'Souza UM, Eisch AJ, Yajima S, Lammers CH, Yang Y, Lee SH, Kim YM, Nestler EJ, Mouradian MM. Dopamine receptor regulating factor, DRRF: a zinc finger transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7558-63.
- 125 D'Souza UM, Lammers CH, Hwang CK, Yajima S, Mouradian MM. Developmental expression of the zinc finger transcription factor DRRF (dopamine receptor regulating factor). *Mech Dev*. 2002 Jan;110(1-2):197-201.
- 126 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444–454.
- 127 Amos CI, Chen WV, Lee A, Li W, Kern M, Lundsten R, Batliwalla F, Wener M, Remmers E, Kastner DA, Criswell LA, Seldin MF, Gregersen PK. High-density SNP analysis

- of 642 Caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2q33. *Genes Immun.* 2006;7(4):277–286.
- 128 Middleton FA, Pato MT, Gentile KL, Morley CP, Zhao X, et al. Genome wide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):886–897.
- 129 Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1alpha gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;153(2):122–126.
- 130 Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Select Evol.* 2002;34(3):275–305.
- 131 Nakamura Y, Koyama K, Matsushima M (1998) VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. *J Hum Genet.* 1998;43(3):149–152.
- 132 Nothen MM, Cichon S, Hemmer S, Hebebrand J, Remschmidt H, et al. Human dopamine D4 receptor gene: frequent occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum Mol Genet.* 1994;3(12):2207–2212.
- 133 Check E. Human genome: Patchwork people. *Nature.* 2005 Oct;Volume 437 Number 7062 pp1065-1206
- 134 Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):949-51.