

# ISMÉTLŐDÉSI POLIMORFIZMUSOK A KUTYA DOPAMINERG GÉNJEIBEN

Doktori tézisek

**Héjjas Krisztina**

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Vezető: **Prof. Erdei Anna**

Vezető: **Prof. Gráf László**



Témavezető:

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

Kutatóhely:

Semmelweis Egyetem,  
Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

Budapest  
2008



## I. BEVEZETÉS

A viselkedés genetikai hátterének 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 meghatározottak, azonban komplex öröklődésűek: a rendellenesség kialakulását sok gén kis hatású változatának együttes előfordulása okozza. A fent említett rendellenességek genetikai meghatározottságának felderítésére a pszichogenetikai vizsgálatokban a kandidáns gének asszociáció-analízisét végzik. Ennek során azt elemzik, hogy a kiválasztott gén allélváltozatai összefüggésbe hozhatók-e az adott fenotípusos jellegzetességgel. A kandidáns géneknek általában a neurotranszmitterek képződésében, lebontásában, illetve a jelátvitelben szerepet játszó fehérjék génjeit tartják.

A pszichogenetikai kutatások egyik legtöbbet vizsgált célgénje a dopamin D4-es receptor 3. exonjában lévő hosszúság polimorfizmus, melynek hosszú allélváltozatát összefüggésbe hozták az újdonságkeresés (impulzivitás) és a kitartás személyiség jegyekkel. Ezt a genetikai variációt az ADHD egyik lehetséges rizikófaktorként is számon tartják.

A viselkedés genetikai hátterének vizsgálatára gyakran használnak állatmodelleket, a legtöbb esetben rágcsálókat. Az utóbbi időben azonban számos közlemény jelent meg a kutyák viselkedéséről, melyek arról tanúskodnak, hogy mind a szociális kötődés, mind az agresszió és koope-

ráció terén is az emberi viselkedés megfelelő modelljének bizonyultak: a kutyákban is megtalálható ugyanis számos az emberével párhuzamba állítható képesség. A viselkedés genetikai kutatások szempontjából szintén döntő jelentőségű, hogy 2005 végére azonosították a kutya genom teljes szekvenciáját, így elkezdődhetek az „*in silico*” vizsgálatok, melynek során internetes adatbázisokból tölthetjük le bármely gén szekvenciáját, illetve a bennük ismert polimorfizmusokat is. Mindezek miatt a kutya a viselkedés-genetikai kutatások jól alkalmazható modell állatává válhat. Ezért is fontos feltérképezni a kutyafajták különböző genetikai polimorfizmusait valamint ezek lehetséges fenotípusbeli megnyilvánulását.

Bár az asszociáció vizsgálatok rendszerint megbízhatóan feltárják egy-egy kandidáns gén és egy adott viselkedés jegy közötti összefüggést, az oki kapcsolat az adott genetikai variáció és a fenotípus között sokszor ismeretlen marad. Az exonokban előforduló polimorfizmusok biológiai következménye rendszerint jobban nyomon követhető, mivel gyakran aminosav cserét okoznak, ami számos módon befolyásolhatja a képződő fehérje működését (pl. megváltozik a fehérje harmadlagos szerkezete, vagy az enzim ill. receptor aktív centruma működésképtelenné válik). Ugyanakkor az utóbbi évek humán polimorfizmus kutatásai egyre nagyobb figyelmet fordítanak a kandidáns gének nem kódoló régióinak (az intronoknak, az 5' és 3' nem kódoló szakaszoknak) funkcionális vizsgálatára is, mivel ezek meghatározó szerepet játszhatnak a génexpresszió szabályozásában. Kevés irodalmi adattal rendelkezünk viszont a kutyákkal történő viselkedés-genetikával kapcsolatos funkcionális vizsgálatokról. Így a humán eredményeket alapul véve, érdekesnek találtuk a hasonló funkcionális vizsgálatok elvégzését.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

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

- 1. Asszociáció analízis a DRD4 3. exon VNTR és a kutyára adaptált ADHD kérdőív skálaértékei között.** A humán vizsgálatokat alapul véve, a populáció stratifikáció elkerülése érdekében egyetlen kutyafajtát (német juhászkutya) vizsgálatunk.
- 2. A kutya DRD4 gén további polimorfizmusainak vizsgálata.** A DRD4 1. exon és 2. intron inzerció/deléción több kutyafajtára kiterjedő populáció vizsgálata, valamint a 2. intron polimorfizmus allélváltozatainak funkcionális vizsgálata luciferáz riporter vektor rendszer segítségével.

**Új polimorfizmusok keresése a kutya neurotranszmisszióval kapcsolatos génjeiben,** melyek további viselkedés genetikai asszociációvizsgálatban hasznosíthatók majd.

- 1. Változó számú ismétlődési polimorfizmusok (VNTR) keresése.** Ismétlődő szakaszok „*in silico*” keresése a kutya dopaminerg génjeiben. Ezen szakaszok PCR alapú vizsgálata több kutyafajtában és farkasban.
- 2. Gén kópiaszám variáció (CNV) keresése.** A kutya dopaminerg és szerotonerg rendszerének néhány génjében található esetleges CNV-k felkutatása, mivel ehhez hasonló vizsgálatokat kutyában eddig még nem végeztek.

### III. MÓDSZEREK

#### A vizsgálatban résztvevő állatok

Az általunk vizsgált populációk DNS-mintáit az ELTE Etológia Tanszéke bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatban résztvevő fajták: 1) Belga juhászkutyák három alcsoportja: a groenendael (N=105), a tervueren (N=101), és a malinois (N=50) változat. 2) Összesen 309 német juhászkutya, ahol két környezetében eltérő csoportot különböztettünk meg: „családi” kutyák (N=137) és rendőr-kutyák (N=172). 3) 99 szibériai husky valamint 4) 22 európai szürke farkas.

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

#### Genotípus meghatározás

Az általunk vizsgált gének szekvenciáit (dopamin D4-es receptor, tirozin-hidroxiláz, dopamin- $\beta$ -hidroxiláz, dopamin-transzporter) a GeneBank és az Ensembl internetes adatbázisokból töltöttük le. A *DRD4* gén 3. exon vizsgálatához egy korábbi tanulmányban közölt szekvenciát alkalmaztunk. Az ismétlődő szakaszok *in silico* keresésére a Tandem Repeats Finder webes kereső programot használtuk.

Az ismétlődési polimorfizmusok vizsgálata során az ismétlődések számát polimeráz láncreakcióval határoztuk meg.

#### Gén kópiaszám polimorfizmus

A génszám változását qPCR (real-time PCR) módszerrel végeztük. A vizsgált génekre (*DRD4*, *TH*, *DBH*, *DAT*, *COMT*, *MAO-A*, *V1aR*) specifikus TaqMan próbákat és primereket terveztünk. A próbák 5' végén reporterként VIC vagy FAM festéket, 3' végén MGB molekulát használtunk quencherként.

## **Tranziens transzfekció**

A funkcionális vizsgálatokat luciferáz riporter rendszerben végeztük. A *DRD4* gén 2. intron allélváltozatait megfelelő restrikciós endonukleáz hasító helyet tartalmazó primerek segítségével pGL3-Basic és pGL3-Control plazmidba klónoztuk. A transzfekciót humán eredetű neuroblasztóma (SK-N-FI) és epitheliális karcinóma (HeLa) sejtvonalakban végeztük. Kontrollként a konstitutívan expresszálódó  $\beta$ -galaktozidáz tartalmú vektort használtuk.

## **Fenotípus meghatározás**

A fenotípus felvétele és kiértékelése, valamint a statisztikai analízis az ELTE Etológia Tanszékén, Dr. Miklósi Ádám vezetésével történt. Az általuk kidolgozott és validált, kutyára adaptált ADHD kérdőívet alkalmaztuk a kutyák aktivitásának-impulzivitásának vizsgálata során.

## **Statisztikai módszerek**

A genetikai asszociáció-vizsgálatoknál az SPSS 10.0 statisztikai programcsomagot használtuk. 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.

## **Rövidítések:**

DRD4: dopamin D4-es receptor, TH: tirozin-hidroxiláz, DBH: dopamin- $\beta$ -hidroxiláz, DAT: dopamin-transzporter, COMT: katechol-O-metiltranszferáz, MAO-A: monoamin-oxidáz A, V1aR: vazopresszin 1a receptor, ADHD: figyelemhiányos hiperaktivitási zavar, bp: bázispár, VNTR: változó számú tandem ismétlődés

## IV. EREDMÉNYEK

1. A kutya *DRD4* gén 3. exonjában található VNTR azonosítására beállítottunk két egymástól független PCR-t. Az általunk vizsgált német juhászkutya populációban két allélt (2 és 3a) azonosítottunk. A kutyákat két csoportra osztottuk eltérő környezetük alapján: rendőr- és családkutyákra. Munkánk során összefüggést kerestünk ezen polimorfizmus és a kutyára adaptált ADHD kérdőív aktivitás-impulzivitás skálája között. **Asszociációt csak a rendőr németjuhászkutyáknál tapasztaltunk, ahol a 2/2 genotípusú egyedek szignifikánsan alacsonyabb aktivitás-impulzivitás értéket értek el, mint a 2/3a és 3a/3a genotípusúak (P = 0,018).**
2. A *DRD4* gén 3. exon VNTR-t a vizsgálatba bevont további kutyafajtákon és a farkasokon is megvizsgáltuk, és ennek során egy **új allélt (8-as allél) sikerült azonosítanunk**, mely a szibériai huskyban és a farkasban meglepően nagy gyakorisággal fordult elő (szibériai husky: 18,2%, farkas: 29,6%).
3. A *DRD4* gén 1. exonjában már leírt 24 bp hosszúságú inzerció / deléciót a fent említett kutyafajtákban és a farkasban szintén megvizsgáltuk. Mindkét vizsgált *DRD4* gén polimorfizmus esetében  $\chi^2$ -próba segítségével hasonlítottuk össze az egyes fajták genotípus gyakoriság értékeit. A kapott eredmény alapján megállapítható, hogy statisztikailag szignifikáns (**P < 0,0001**) különbség mutatkozik az egyes csoportok genotípus eloszlás értékei között.
4. A *DRD4* gén 2. intronjában lévő 17 bp hosszúságú inzerció / deléció polimorfizmus az irodalomból már korábbról ismert volt, azonban *in silico* analízis alapján megfigyeltük, hogy ez a polimorfizmus a 17 bp



hosszú szakasz változó számú ismétlődésének (**VNTR**) tekinthető. A régió funkcionális aktivitását *in vitro* rendszerben vizsgáltuk kétféle sejtvonalon (SK-N-FI és HeLa) és kimutattuk, hogy **a vizsgált szakasz *in vitro* rendszerben promóterszerű** tulajdonsággal rendelkezik, valamint a neuronális sejtvonallal kapott eredmények alapján elképzelhető, hogy az egyes allélváltozatok szerepet játszhat a **génexpresszió szabályozásában**.

5. ***In silico* analízissel további ismétlődő szakaszokat találtunk a kutya dopamin rendszer génjeiben.** A *TH* gén 4. intronjában egy 36 bp hosszú szakasz egyszeres vagy kétszeres előfordulását, a *DBH* gén 4. intronjában egy 17 bp hosszú szakasz egyszeres vagy háromszoros ismétlődését, a *DAT* gén 9. intronjában egy 38 bp hosszú szakasz egyszeres illetve kétszeres ismétlődését azonosítottuk az általunk vizsgált öt kutyafajtában és a farkasban. Az egyes fajták genotípus frekvenciái között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott ( $P < 0,0001$ ), és a mért genotípus gyakoriságok megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

6. Beállítottunk egy real-time PCR alapú eljárást a kutya dopaminerg és szerotonerg génjeiben esetlegesen előforduló **CNV-k keresésére**. Szekvencia specifikus TaqMan próbákat terveztünk az általunk vizsgált 7 génre. A génszám vizsgálatát relatív kvantifikálással, a  $\Delta C_T$  kiértékelési módszer alkalmazásával végeztük. Mivel a CNV-kkel kapcsolatban semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésünkre, így a kiértékelés során a vizsgált célgéneket egymáshoz viszonyítottuk. A vizsgálatba 20 egyedet vontunk be az általunk vizsgált öt fajtából. **A vizsgált gének egyike esetében sem találtunk 2-től eltérő génszámot** tehát a vizsgált kutya populációk genomjának ezen régióiban nem fordul elő olyan CNV, melynél a variáció gyakorisága eléri az 5%-ot.

## V. KÖVETKEZTETÉSEK

A viselkedés-genetikai kutatásokban egyre inkább elterjed az állatmodellek alkalmazása. Jelen tanulmányban mi a kutyát választottuk modell állatnak, mivel 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 találtunk a kutya-ADHD kérdőív aktivitás-impulzivitás skálája és a *DRD4* VNTR között a rendőrnémet juhászkutyákban. 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 polimorfizmusról megállapítottuk, hogy egy 17 bp-os szakasz variábilis ismétlődésének tekinthető, funkcionálisan aktívnek, promoter jellegűnek találtuk *in vitro* rendszerben.

Korábban még nem azonosított polimorfizmusokat találtunk a kutya tirozin-hidroxiláz, dopamin- $\beta$ -hidroxiláz és dopamin-transzporter génjeiben. Az új polimorfizmusok további asszociáció és funkcionális vizsgálatok célpontjai lehetnek.

Beállítottunk egy qPCR-en alapuló módszert a kutya dopamineg és szerotonerg génjeiben esetlegesen megtalálható gén kópiaszám változások vizsgálatára. Kísérleteink alátámasztották a kidolgozott technika megbízhatóságát, ugyanakkor a vizsgált régiókban CNV variációt nem sikerült azonosítanunk.

## **VI. 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)

## VII. 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 rejtelseire, 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 analízisért,

A laboratórium összes munkatársának kedvességükért, segítségükért, és a vidám, barátságos légköréért.