

Genetski polimorfizmi – potencialni biološki označevalci v psihiatriji

Genetic polymorphisms – potential biomarkers in psychiatry

Sandra Ropret, univ. dipl. biokem.

doc. dr. Alja Videtič Paska, univ. dipl. biokem.

Inštitut za biokemijo,
Medicinska fakulteta UL,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

Avtor za dopisovanje/corresponding author:

Sandra Ropret, univ. dipl. biokem.

Medicinska fakulteta,
Inštitut za biokemijo
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
e-pošta: sandra.ropret@mf.uni-lj.si

Izvleček

Izhodišča: Psihiatrične motnje so kompleksne bolezni, na njihov razvoj vplivajo tako dedni kot okoljski dejavniki. Slednji imajo vlogo sprožanja in moduliranja dednih dejavnikov, ki lahko prispevajo k razvoju motnje. Biološki vzroki psihiatričnih motenj so še vedno precej nejasni, je pa opazno povečano zanimanje za vključevanje bioloških testov v psihiatriji. Ti testi lahko temeljijo na preučevanju malih molekul v telesnih tekočinah, proteinskih in genetskih označevalcih ali pa na tehnikah funkcionalnega slikanja možganov. Med genetske označevalce prištevamo specifične gene, genetske polimorfizme in mutacije. Z metaanalizami lahko iz množice objavljenih študij izluščimo gene in polimorfizme, ki so

pomembni za nastanek in razvoj motnje. Obstoj genetskih dejavnikov tveganja za pojav neke psihiatrične motnje bi lahko ugotavljali z DNA-mikromrežami, prirejenimi za psihiatrijo. Za dejansko uporabnost v klinični praksi pa bi biološki označevalci in tehnologija morali ustrezati določenim kriterijem, kot so univerzalnost in nedvoumna zveza biološkega označevalca z neko motnjo ter cenovna dostopnost tehnologije DNA-mikromrež.

Zaključki: Dobro raziskana biološka osnova in iz tega izhajajoči potrjeni biološki označevalci ter nadaljnji razvoj tehnologije in s tem nižja cena DNA-mikromrež imajo mesto v prihodnosti psihiatrične diagnostike.

Ključne besede: psihiatrične motnje, dedni dejavniki tveganja, DNA-mikromreže, diagnostika.

Uvod

Naraščajoče število dokazov podpira vključenost tako dednih kot okoljskih dejavnikov tveganja v razvoj mnogih psihiatričnih motenj, med drugimi depresije (angl. Major Depression Disorder, dalje MDD) in samomorilnega vedenja (angl. Suicidal Behavior, dalje SB)¹. Gre za kompleksni in heterogeni duševni motnji, h katerima prispeva tudi kombinacija variacij v številnih genih. Vsaka variacija prispeva le majhen delež, tako z vidika tveganja nastanka motnje kot tudi same simptomatike. Hkrati pa številni dokazi podpirajo kritično vlogo okoljskih dejavnikov pri sprožanju in modulaciji dedne nagnjenosti k MDD in SB^{2,3}.

Biološki vzroki mnogih psihiatričnih motenj so kljub številnim raziskavam na tem področju še vedno precej nerazjasnjeni, prav tako pa je težavna tudi natančna kategorizacija tovrstnih motenj. V zadnjih desetih letih je opaziti povečano zanimanje za vključevanje bioloških označevalcev v psihiatriji, kar se odraža v eksponentnem porastu števila znanstvenih publikacij na to temo⁴. Biološki označevalec je po definiciji neka objektivno merljiva lastnost, ki lahko služi kot indikator normalnih bioloških in/ali patoloških procesov kot tudi farmakološkega odziva bolnika na neko terapijo⁵.

Informacija v obliki biološkega označevalca je opredeljena kot verjetnost za obstoj tveganja za pojav nekega bolezenskega stanja ali vedenjskega vzorca. Treba pa se je zavedati, da izvzetost take informacije iz okvira vplivov okolja na posameznika ne omogoča celovite razlage stanja oziroma vedenja ali celo napovedi vpliva na posameznikovo življenje. Sama biologija, torej biološki označevalci, nam lahko ponudi informacijo zgolj o obstoju oziroma obstoju potencialnega tveganja za razvoj nekega stanja⁴.

Biološki označevalci se torej lahko uporabljajo kot pripomoček pri postavljanju diagnoze, biološki potrditvi oziroma podpori k že postavljeni diagnozi ali pa pomagajo pri izboru najučinkovitejše terapije, določanju potrebnega odmerka zdravila in spremljanju odziva posameznika na terapijo. V psihiatriji so biološki označevalci uporabni za zaznavanje, oceno in napoved možnosti razvoja motnje kot tudi osebnostnih, vedenjskih lastnosti in kognitivnih sposobnosti posameznika. Poleg tega pa lahko služijo tudi kot podpora k odločitvam lečečega psihiatra glede na potek zdravljenja. Primeri potencialnih bioloških označevalcev v psihiatriji so meritve specifičnih razlik v prevodnosti kože, specifične aktivnosti živčnih celic v določenih možganskih regijah, specifični endofenotipi (biokemijske, nevrofiziološke in nevro-

sihologske lastnosti posameznika) in specifični genetski polimorfizmi⁴. Genetski polimorfizmi poleg kandidatnih genov in njihovih mutacij sodijo v skupino genetskih bioloških označevalcev, ki so povezani s simptomi psihiatričnih motenj⁶. V našem prispevku bo tekla beseda o genetskih bioloških označevalcih, ki predstavljajo dedno komponento tveganja za pojav psihiatričnih motenj.

Genetski polimorfizmi in kandidatni geni v psihiatriji

Večina sprememb v zaporedju DNA ni patoloških in te imenujemo polimorfizmi. Po definiciji je polimorfizem razlika v zaporedjih DNA posameznikov, ki se pojavlja pri več kot 1% populacije. Ker je le 1–2% človeškega genoma kodirajočega (vsebuje zapis za gene), večina polimorfizmov ne vpliva neposredno na funkcijo genov. Kljub temu pa se nekateri polimorfizmi nahajajo znotraj genov ali v njihovih regulatornih regijah in ti lahko povzročijo funkcionalne posledice, ki vplivajo na izražanje genov v obliki proteinov. Poznamo vrsto različnih polimorfizmov (povzeto po Tabeli 2.6)⁷:

- različno število tandemskih ponovitev nekoliko daljših zaporedij DNA (angl. Variable Number of Tandem Repeat, VNTR), kamor sodijo makro- in minisatelitska zaporedja;
- ponovitve preprostih, krajših zaporedij DNA oz. mikrosatelitska zaporedja (angl. Simple Sequence Repeat, SSR) in
- enonukleotidni polimorfizmi (angl. Single Nucleotide Polymorphism, dalje SNP), pri katerih se en sam nukleotid zamenja z drugim.

Kljub velikemu številu znanstvenih publikacij na temo polimorfizmov v kandidatnih genih, ki predstavljajo tveganje za razvoj MDD in SB, je v številnih primerih težko z gotovostjo potrditi, da neki polimorfizem predstavlja tveganje za njun razvoj. Povedano velja tudi za gene, o katerih je več študij pokazalo pozitivno zvezo z MDD in SB. Problem izvira iz razlik med zasnovano študij, ki uporabljajo zelo različne populacijske vzorce (različne etnične skupine in različne psihiatrične motnje) in metode vzorčenja, vrednotenja rezultatov in tudi testiranja različnih polimorfizmov ali kombinacij le-teh. Na tem mestu pride do izraza uporabnost t. i. metaanaliz, te lahko izluščijo polimorfizme, ki se v množici študij stalno pojavljajo kot dejavniki tveganja. Metaanalize namreč statistično analizirajo študije, ki obravnavajo isto tematiko, pri čemer izločijo dejavnike heterogenosti

med študijami¹. Objavljene metaanalize so izluščile ponavljajoče se ugotovitve glede polimorfizmov nekaterih kandidatnih genov, ki so ali v pozitivni ali negativni povezavi s tveganjem za razvoj psihiatričnih motenj. Gre za gene ki nosijo zapis za¹:

- serotoninski transporter (SLC6A4),
- serotoninski receptor 1A in 2A (HTR1A in HTR2A),
- triptofanhidroksilazo in nevronska triptofanhidroksilazo (TPH in TPH2),
- monoaminoksidazo A (MAOA),
- tirozinhidroksilazo (TH),
- katehol-o-metiltransferazo (COMT),
- možganski nevrotrofični dejavnik (BDNF),
- apolipoprotein E (APOE), metilentetrahidrofolatreduktazo (MTHFR), angiotenzin I pretvarjajoči encim (ACE1), gvaninnukleotid vezavni protein beta (3GNB3), estrogenski receptor 1 (ESR1) in enega od proteinov cirkadialnega ritma (CLOCK).

Geni, katerih polimorfizmi naj bi prispevali k razvoju MDD in/ali SB (to je v dveh ali več neodvisnih študijah ali pa v večjih metaanalizah), so: *SLC6A4*, *HTR2A*, *TPH2*, *ACE* in *BDNF*. Večkratno potrditev pozitivne zveze le z MDD so pokazali za polimorfizme v genih *TH*, *MAOA*, *COMT*, *APOE*, *GNB3* in *MTHFR*, zvezo le s SB pa za polimorfizme genov *TPH1* in *DRD2* (gen za dopaminski receptor D2) (povzeto po Tabeli 1)¹.

Uporaba genetskega testiranja v psihiatriji

Že v začetku tega poglavja velja poudariti, da je genetsko testiranje zgolj eno od številnih možnih testiranj. Namen tovrstnega testiranja bi lahko bilo presejanje posameznikov za določanje obstoja tveganja za razvoj neke psihiatrične ali vedenjske motnje. Torej zgolj ugotavljanje biološkega potenciala, ki ga pri nekem posamezniku določajo kandidatni geni in/ali njihovi polimorfizmi. Na tem mestu se takoj postavi vprašanje, katere osebe, če sploh koga, bi na ta način preventivno testirali. Takšno testiranje pride v poštev na primer za osebe, ki imajo tovrstne motnje v družini, seveda ob predpostavki, da je to dejstvo znano oziroma zapisano pri zdravniku (splošnem ali pa specialistu psihiatrije), obenem pa je opaziti spremembe v človekovem vedenju, ki nakazujejo razvoj motnje. Tovrstni testi, vsaj z etičnega vidika, torej niso namenjeni preventivi (ki je sicer vsekakor boljša od kurative), temveč bi lahko služili izključno lečečemu psihiatru kot potrditev diagnoze oziroma podpora za odločitve o najprimernejši terapiji oseb, ki so (začetek) motnjo že razvile. Družbene in etične dileme

tovrstnega testiranja (predvsem preventivnega pri otrocih) pa med drugimi lepo izrazita avtorja Singh in Rose v svojem prispevku⁴.

V psihiatriji bi bil uporaben specialen genetski test, ki bi moral ustrezati naslednjim pogojem:

- Testirani biološki označevalci (polimorfizmi) so univerzalni pokazatelj obstoja tveganja, ne glede na raso in spol.
- Testirani biološki označevalci (polimorfizmi) se v življenju posameznika ne spreminjajo.
- Genetski polimorfizmi morajo biti v genih oziroma v zunajgenskih območjih, ki vplivajo na izražanje kandidatnih genov. Le-ti morajo biti dokazano relevantni za pojav neke psihiatrične motnje.
- Testirani biološki označevalci morajo biti taki, da s čim višjo stopnjo gotovosti omogočajo razlikovanje med osebami s tveganjem in ostalimi brez tveganja.
- Testirani biološki označevalec mora omogočiti razlikovanje ne le med (potencialno) obolelimi in neobolelimi, temveč mora opredeliti tudi stopnjo tveganja za razvoj različnih bolezni⁸.
- S testom med seboj razlikujemo različne motnje.
- Test mora temeljiti na uporabi lahko dostopnega biološkega materiala, recimo krvi, katerega odvzem ni neprijeten za bolnika. Alternativa krvi bi lahko bil bris ustne sluznice⁹.
- Cenovna dostopnost testov.
- Ker so psihiatrične motnje kompleksne in tudi poligeneske, kar pomeni da k razvoju simptomov prispeva specifičen nabor kandidatnih genov ali njihova kombinacija⁶, je jasno, da je potrebno testirati prisotnost/odsotnost več bioloških označevalcev. Torej je treba testirati določen nabor oziroma panel označevalcev.

Na tržišču so že prisotna podjetja, ki ponujajo genetska testiranja na osnovi polimorfizmov v kandidatnih genih. Ta testiranja posameznika seznanijo s stopnjo tveganja za razvoj neke bolezni (na primer kardiovaskularnega obolenja). Ti testi so izjemno dragi, zelo splošni, kakovost napovedi pa vprašljiva, na kar je stroka pri nas in tudi v tujini že opozorila^{10, 11}.

DNA-mikromreže (biočipi)

DNA-mikromreže so sodobno molekularnobiološko orodje, ki omogoča biomedicinske preiskave na ravni celotnega genoma. Običajno so narejene z zelo kratkimi odseki DNA, ki so točkovno nanoseni na inertni nosilec (na poseben način obdelano steklo). Nane-

seni odseki DNA vsebujejo enoverižna zaporedja nukleotidov iz različnih delov genoma in njihovih različic (polimorfizmi). Med preiskavo na pripravljene DNA-mikromreže nanese predhodno označeno DNA preiskovanega vzorca, ki se komplementarno pari oziroma poveže (hibridizira) z ustrežajočimi kratkimi odseki DNA, ki so vezani na nosilcu. Po hibridizaciji nevezano DNA speremo. Le mesta, ki so se hibridizirala, tvorijo obarvane točke, ki jih analiziramo s pomočjo čitalcev. Na ta način lahko dobimo določene genetske informacije, ki so specifične za preiskovani genom. Torej, genetskim preiskavam, ki so bile do nedavnega osredotočene le na preiskave bodisi posameznih genov ali le določenega odseka DNA, je razvoj mikromrež omogočil izvedbo na kompleksnejši, globalni ravni¹². Mikromreže se uporabljajo v številne namene, in sicer za¹³:

- Preučevanje izražanja genov (to je klasični in primarni namen uporabe DNA-mikromrež).
- Globalno genotipizacijo SNP. Človekov genom namreč vsebuje več kot 10 milijonov SNP in za mnoge med njimi obstajajo dokazi o povezavi s kompleksnimi boleznimi oziroma lastnostmi.
- Presejanje genoma za različno število ponovitev določenih odsekov DNA, to je strukturnih variacij DNA, kot so duplikacije in delecije (angl. Copy Number Variation, CNV).
- Visoko zmogljivostne študije posledic izgube funkcije genov (angl. high-throughput loss-of-function studies), ki temeljijo na uporabi RNAi-mikromrež in celičnih kultur (angl. RNAi cell microarrays)^{13,14}.
- Kartiranje regulatornih mrež. Primer je metilacija DNA, ki je eden od najpomembnejših regulatorjev izražanja genov. Stanje metilacije je namreč spremenjeno pri mnogih boleznih in je povezano z odzivom na zdravila in drugimi dejavniki, kot je na primer staranje organizma. Kartiranje metilacijskih vzorcev celotnega genoma nam da informacijo o povezavi genetika – okolje – zdravje.
- Diagnostiko in k bolniku usmerjeno medicino.
- Odkrivanje in razvoj zdravilnih učinkovin, na primer za identifikacijo tarče zdravilne učinkovine so uporabne ekspresijske mikromreže, na katerih primerjamo profil izražanja genov v obliki mRNA v zdravem in testnem tkivu.
- Identificiranje genetskih mutacij. S pomočjo mikromrež lahko na primer zaznamo spremembe nukleotidnega zaporedja in izražanja nekega gena.

DNA-mikromreže vsekakor omogočajo testiranje stotine genov, ki lahko napovejo pomen dedne komponente v razvoju tveganja za določene bolezni. Bistveno je vprašanje, ali je genetska komponenta tveganja pri kompleksnih boleznih dovolj robustna za postavitev diagnoze, za uvedbo k bolniku usmerjenega zdravljenja in za preventivne programe¹⁵.

Potencialna uporaba mikromrež v psihiatriji

Največja vrednost genetskega zapisa je njegov napovedni potencial za dedno nagnjenost posameznika k razvoju bolezni. S pravočasnim testiranjem bi lahko ukrepali še pred pričetkom zdravljenja in tako vplivali na njegovo usmeritev¹⁶.

Mikromreže v psihiatriji bodo (v prihodnosti) svoje mesto našle v okviru diagnostike in k bolniku usmerjene medicine. Dober primer so že obstoječi testi, ki diagnostičnim laboratorijem omogočajo identifikacijo naravnih variacij v genih *CYP2D6* in *CYP2C19*, katerih produkti so citokromi P450, ki so pomembni pri presnovi zdravilnih učinkovin. Njihove variacije vplivajo na farmakokinetiko presnove mnogih zdravil, ki se uporabljajo za zdravljenje MDD, shizofrenije, bipolarni motnje in drugih bolezni. Poznavanje variacij in njihove vloge lahko lečečemu zdravniku pomaga pri izbiri najprimernejše terapije in pravega odmerka za bolnika, prav tako pa mu omogoča, da se izogne predpisu zdravila, ki bi pri bolniku povzročilo neprijetne stranske učinke¹³.

Na tem mestu velja omeniti test, ki je še v razvoju. Zdravniku bo omogočal identifikacijo genetskih bioloških označevalcev, ki napovejo stopnjo tveganja samomorilnega vedenja pri bolnikih, ki so jim predpisani določeni antidepresivi. Na trg naj bi prišel v 18 mesecih od datuma objave novice na spletu (december 2013)¹⁷. Tehnologija testa še ni natančno opredeljena, vendar pa bo skoraj zagotovo temeljil na tehnologiji DNA-mikromrež. Z omembo tega testa želimo poudariti aplikativno uporabnost rezultatov raziskovalnega dela, v tem konkretnem primeru se je to zgodilo na Psihiatričnem inštitutu Maxa Plancka v Münchnu v Nemčiji¹⁸.

Zaključek

Psihiatrične motnje so posledica različnih dejavnikov (angl. multi-factorial) in sovplivanja med njimi. So poligenske, kar pomeni, da je v mehanizmu motnje vključenih več genov ali celo družin genov. Kljub številnim dosedanjim raziskavam še ne poznamo identitete številnih genov, ki bi lahko imeli ključno vlogo pri nastanku duševne motnje oziroma ne poznamo glavnih procesov, pri katerih so ti geni in njihovi produkti udeleženi¹⁹. Poleg tega produkti izražanja genov ne delujejo izolirano, temveč v zelo kompleksnih medsebojnih povezavah, in pri izpostavitvi posameznika okoljskim dejavnikom tveganja se lahko pojavijo spremembe v izražanju²⁰. Številni od danes identificiranih genov oziroma produktov njihovega izražanja so povezani s širokim naborom psihiatričnih simptomov. Zato jih še ne moremo uporabiti za zanesljivo diagnostiko posameznih duševnih motenj¹⁹. Kot rečeno, je poleg genetskih dejavnikov treba upoštevati tudi vpliv okolja in življenjskega sloga. Slednja skupaj z genetskimi dejavniki pomembno vplivata na razvoj in napredovanje psihiatrične motnje⁶.

DNA-mikromreže imajo velik potencial za uporabo tudi v psihiatriji, vendar mora za klinično testiranje tehnologija postati cenovno dostopnejša. Poleg trenutne cenovne (ne)dostopnosti za širšo uporabo pa je potrebnih še veliko temeljnih raziskav, ki bodo identificirale in potrdile (nove) kandidatne gene in njihove polimorfizme. V naslednji stopnji pa bi iz nabora izluščili gene/polimorfizme, ki bi se izkazali kot univerzalni za vse populacije in obenem specifični le za določeno bolezen. K potrjevanju kandidatnih genov in polimorfizmov nedvomno veliko pripomorejo metaanalize. Da pa bi rezultati metaanaliz dejansko prispevali k uporabnim zaključkom, potrebujemo predvsem več temeljnih raziskav s primerljivo zasnovo in čim večjim številom dobro opredeljenih vzorcev.

Literatura

1. Mandelli L., Serretti A. (2013): Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: an update. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37: 2375–2397.
2. Saveanu R.V., Nemeroff C.B. (2012): Etiology of depression: genetic and environmental factors. *Psychiatr. Clin. North Am.* 35: 51–71.
3. Roy A., Sarchiopone M., Carli V. (2009): Gene-environment interaction and suicidal behavior. *J. Psychiatr. Pract.* 15: 282–288.
4. Singh I., Rose N. (2009): Biomarkers in psychiatry. *Nature* 460: 202–207.
5. Biomarkers definitions working group (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69: 89–95.
6. Lakhan S.E., Vieira K., Hamlat E. (2010): Biomarkers in psychiatry: drawbacks and potential for misuse. *Int. Arch. Med.* 3: 1.
7. Trent R.J.: Molecular medicine, Third edition: from genomics to personalized healthcare. Academic Press; 2005: 31–34.
8. Boksa P. (2013): A way forward for research on biomarkers for psychiatric disorders [editorial]. *J. Psychiatry Neurosci.* 38: 75–77.
9. Abraham J.E., Maranian M.J., Spiteri I., Russell R., Ingle S., Luccarini C. et al. (2012): Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Med. Genom.* 5: 19.
10. Zupanič M. Nedelo: Genske analize – velik izziv in posel desetletja. 29. 5. 2011. Pridobljeno s spleta dne 26. februarja 2014. Dosegljivo na: <http://www.delo.si/druzba/zdravje/nedelo-genske-analize-ndash-velik-izziv-in-posel-desetletja.html>
11. Dobra novica: Slovenska genetika v samem vrhu. "Vsak bolnik si zasluži, da ga obravnava zdravnik, ki pozna njegovo bolezen." 14. 10. 2013. Pridobljeno s spleta dne 26. februarja 2014. Dosegljivo na: <http://novice.najdi.si/predogled/novica/2bc42833bb7bb8957dec00e8b3e309b2/Politikis/Slovenija/Dobra-novica-Slovenska-genetika-v-samem-vrhu-Vsak-bolnik-si-zaslu%C5%BEi-da-ga-obravnavava-zdravnik-ki-pozna-njegovo-bolezen>
12. Jerman B. Mikromreže – biočipi. 14.3.2011. Pridobljeno s spleta dne 4. januarja 2014. Dosegljivo na: <http://bionovice.si/mikromreze-biocipi/>
13. Yan J., Gu W., Jiao Y.: Application of DNA microarray technology in genetics. In: Current topics in human genetics: studies in complex diseases (Shen H., Deng H.-w. Hackensack N.J., eds.). World Scientific; 2007: 385–391.
14. Wheeler D.B., Carpenter A.E., Sabatini D.M. (2005): Cell microarrays and RNA interference chip away at gene function. *Nat. Genet.* 37: S25–S30.
15. Plomin R., Davis O.S.P. (2009): The future of genetics in psychology and psychiatry: Microarrays, genome-wide association, and non-coding RNA. *J. Child Psychol. Psychiatry* 50: 63–71.
16. Costa e Silva J.A. (2013): Personalized medicine in psychiatry: New technologies and approaches. *Metabolism* 62: S40–S44.
17. MPI of psychiatry. Suicidality test being brought to market. 12. 12. 2013. Pridobljeno s spleta dne 5. januarja 2014. Dosegljivo na: <http://www.mpg.de/7653934/suicidality-test-Sundance>
18. Menke A., Domschke K., Czamara D., Klengel T., Hennings J., Lucae S. et al. (2012): Genome-wide association study of antidepressant treatment-emergent suicidal ideation. *Neuropsychopharmacology* 37: 797–807.
19. Lakhan S.E., Vieira K.F. (2009): Schizophrenia pathophysiology: are we any closer to a complete model? *Ann. Gen. Psychiatry* 8: 12.
20. Kendler K.S. (2006): Reflections on the relationship between psychiatric genetics and psychiatric nosology. *Am. J. Psychiatry* 163:1138–1146.