

Heroinfüggőség és metadon terápia: a dopaminerg polimorfizmusok lehetséges szerepe

Fibroblaszt modell alkalmazása a metabolikus stressz-kezelés expressziós hatásainak vizsgálatára

Doktori tézisek

Vereczkei Andrea

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Barta Csaba, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Réthelyi János, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Kabai Péter, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kovalszky Ilona, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Töröcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Speer Gábor, Ph.D., ambulanciavezető főorvos

Budapest
2015

I. Bevezetés

A kábítószer-függőség világszerte súlyos társadalmi és egészségügyi probléma. Annak ellenére, hogy az utóbbi években mind Magyarországon mind Európán belül csökkent azok száma, akik első ízben próbálták ki a heroint, a függőség továbbra is komoly problémát jelent, melyet tovább súlyosbít más intravénás drogok előtérbe kerülése. A kábítószer-függőség, mint pszichiátriai rendellenesség bizonyítottan komplex öröklődésű jelleg, így a genetikai tényezőkön kívül a környezeti tényezők, valamint a gén-környezet interakciók is fontos szerepet játszanak a függőség kialakulásában. Az utóbbi évtizedek kutatásából egyértelműnek látszik, hogy a függőség kialakulásának vizsgálata során nem néhány nagyhatású gént kell keresnünk, hanem sokkal inkább több, önmagában kis hatással bíró polimorfizmus állhat a háttérben, amelyek együttesen hozhatják létre a becsült 30-70%-os örökölhetőségi arányt. A drogfüggőség kialakulásának genetikai vizsgálataiban elsősorban az agyi jutalmazó rendszer, és a drogok patomechanizmusában résztvevő útvonalak kandidáns géneit vizsgálják.

A bemutatásra kerülő munkában a dopaminerg rendszer polimorfizmusainak és a heroinfüggőség genetikai rizikójának kapcsolatát vizsgáltam.

Hasonló megközelítési módot alkalmaztam a heroinfüggőség kezelésére használt szubsztitúciós metadon terápia hatásosságának vizsgálatában is. Mivel a kezelésbe bevont betegek terápiás válaszai különbözőek lehetnek, így a kezelés hatékonyságát befolyásoló tényezők keresése és a kezelés költséghatékonyabbá tétele igen fontos részét képezi a kábítószer-függőséggel kapcsolatos genetikai kutatásoknak.

A genetikai megközelítés mellett manapság egyre elterjedtebb a primer sejt kultúrák modellrendszereinek alkalmazása a komplex jellegek molekuláris hátterének feltárására. Külföldi tanulmányutam alkalmával lehetőségem nyílt egy ilyen modellrendszer beállítására, melyben a metabolikus stressz által kiváltott mRNS és mikroRNS expressziós változásokat vizsgáltuk fibroblaszt modellen. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a modell biztató eredményekkel szolgál és esetlegesen alkalmazható lenne a pszichiátriai rendellenességek molekuláris hátterének vizsgálatában is.

II. Célkitűzések

Doktori munkám fő irányvonalát a heroinfüggőség és a dopaminerg gének asszociáció vizsgálata alkotja. Négy dopaminerg gén összesen 11 polimorfizmusának vizsgálatát tűztük ki célul. A vizsgálni kívánt génvariánsok közül egyes allélek drogfüggőséggel való kapcsolatát már korábban is vizsgálták, azonban ellentmondó eredmények születtek. A hazai mintán elvégzett vizsgálataink célja az volt, hogy állást foglaljunk a következő kérdésekben:

1. Releváns tényezők-e a dopaminerg rendszer génjei a heroinfüggőség kialakulásának genetikai hátterében?
2. Az irodalomban oly széles körben vizsgált *TaqIA* polimorfizmus valóban elsődleges tényező-e a függőség kialakulásának öröklött hátterében?
3. A konvencionális statisztikai számítások eredményein túl milyen új információk nyerhetők az alkalmazott Bayes-i bioinformatikai elemzéssel (BN-BMLA -

Bayesian network based Bayesian Multilevel Analysis of relevance)?

A heroinfüggőség kezelésében szerepet játszó metadon szubsztitúciós kezelés hatékonysága ambivalens képet mutat a kezelések kimenetele szempontjából. A helyettesítő terápiában résztvevő betegek mintáit felhasználva szeretnénk volna kideríteni, hogy mely genetikai variánsok játszhatnak szerepet a kezelések hatékonyságában. Az ilyen jellegű vizsgálatok személyre szabott terápia kialakítását tehetik lehetővé a jövőben, ezért a következő kérdésre fókuszáltunk:

4. Az általunk vizsgált dopaminerg gének polimorfizmusai szerepet játszhatnak-e a kezelési hatékonyság megjósolásában?

Doktori munkám részét képezi egy olyan biológiai modell beállítása is, mely esetleg alkalmas lehet a pszichiátriai rendellenességek molekuláris hátterének kutatásához. A modell alapvető hipotézise az, hogy egészséges és beteg (pl. drogfüggő) személyekből származó fibroblaszt sejtkultúrák eltérő expressziós választ adnak metabolikus stressz hatására, és ezen

eltérések markerei lehetnek az idegrendszeri változásoknak. Első lépésként egészséges személyekből származó fibroblaszt modellen kívántuk megvizsgálni a metabolikus stressz hatására kialakuló mRNS és miRNS expresszió változásokat a következő kérdésekre koncentrálni:

1. Kétféle metabolikus stressz kezelést (glükóz, illetve koleszterin megvonás) alkalmazva mennyiben hasonlók a stressz hatására kialakuló mRNS és miRNS expressziós változások?
2. Kimutatható-e kapcsolat az mRNS és miRNS expressziós mintázatok változása között?
3. Kimutathatók-e relevánsan változó molekuláris útvonalak a kontroll és stressz-kezelt fibroblaszt sejtek expressziós mintázatai között, és ha igen, mely útvonalakat érinti a változás?

III. Módszerek

Vizgált személyek és minták előkészítése

A heroinfüggőség genetikájának vizsgálatába 303 heroinfüggő beteg - ebből 173 metadon kezelt - és 555 egészséges kontroll személyt válogattunk be, tőlük a részletes tájékoztatás és beleegyező nyilatkozat után vattapálcával szájnyalkahártya mintát gyűjtöttünk. Laborunkban ezután történt meg a DNS-ek izolálása.

A fibroblaszt sejttenyészetek vizsgálata során 17 egészséges személy kriobankos fibroblaszt mintáin végeztük el a különböző stresszkezeléseket, majd a begyűjtött sejtekből RNS izolálást végeztem.

Genotipizálás

A hosszúság polimorfizmusok genotípusának meghatározása PCR-t követő gélelektroforézissel, míg az egyponos variációk PCR-RFLP és allél-specifikus amplifikáció módszerekkel történtek.

Asszociáció vizsgálat

A heroinfüggőség vizsgálatában az eset és kontroll csoportok összehasonlítását hagyományos khi-négyzet próba mellett egy többszintű relevanciaelemzéses statisztikai módszerrel is kiegészítettük (BN-BMLA).

Expresszió vizsgálat

A fibroblasztokból izolált RNS-ek minőség-ellenőrzésére Agilent 2100 Bioanalyzert használtam, majd az Enzo Life Sciences' 100-Reaction Single-Round RNA Amplification and Biotin Labeling System kittel cDNS szintézist, amplifikációt és biotinos jelölést végeztem az Affymetrix® protokoll alapján. 5 µg biotinnal jelölt, fragmentált aRNS került hibridizálásra a GeneChip HT HG-U133+ PM Array Plate chipre, amely folyamatot – beleértve a hibridizációt, a tisztítási lépéseket, a festést, a képgenerálást, szegmentációt és a minőségi analízist – a Vanderbilt microarray központ munkatársai, míg a miRNS-ekkel kapcsolatos vizsgálatokat a Mirnics Labor munkatársai végezték.

Az expressziós adatok kiértékelését Microsoft Excelben végeztem, továbbá hierarchikus klaszterezéssel, útvonal analízissel is kiegészítettem a vizsgálatot. Az expressziómérés eredményeit RT-PCR módszerrel validáltam.

IV. Eredmények

Heroinfüggőség és a dopaminerg gének asszociációja

1. A genetikai asszociáció analízis első lépésben konvencionális (frekvencia) statisztikai módszerekkel történt, ahol **az eset (heroinfüggők) és a kontroll csoport genotípus gyakoriság értékeit hasonlítottuk össze (eset-kontroll modell)**. Ezen eredmények alapján az általunk vizsgált egyes DRD2 és DRD4 génpolimorfizmusok szignifikáns asszociációt mutatnak a heroinfüggőség kialakulásával. Ugyanakkor a többszörös tesztelés miatt szükségessé vált **Bonferroni korrekciót követően csupán a DRD2 TaqIB polimorfizmus gyakoriság értékei adtak szignifikáns eltérést a kontroll és a heroin függő csoportok között**. A kiértékelés során a frekvencia statisztikai módszer mellett **alkalmaztuk a Bayes háló alapú bayesi többszintű relevancia elemzést (Bayesian network based Bayesian Multilevel Analysis of relevance, BN-BMLA) is, mely a hagyományos eset-kontroll elemzésünkkel összhangban megerősítette a TaqIB relevanciáját a heroinfüggés vonatkozásában.**

2. A szakirodalomban a heroinfüggőséggel kapcsolatban elsősorban a *TaqIA* szerepét írták le, így vizsgálatunkba mi is belevettük ezen rs1800497-es variánst, ám a többszörös tesztelés előtt mutatott nominális szignifikancia a Bonferroni korrekció után eltűnt, szemben a ***TaqIB*** hatásával, ami **vizsgálatunk legerősebb és legrelevánsabb eredménye.**

3. Munkánk során először használtuk a BN-BMLA módszert, ezért kíváncsiak voltunk rá, hogy a hagyományos eset-kontroll elemzés eredményei mennyire egyeznek a hálózatos módszer eredményeivel. Örömmel tapasztaltuk, hogy a kétféle módszerrel kapott eredmények összecsengenek. **A mindkét módszerrel azonosított direkt hatásokon kívül azonban a BN-BMLA képes volt egy indirekt hatás kimutatására is, a DRD4 -521 C/T és a DRD4 -615 A/G polimorfizmusok interakciójára. Ezt az interakciót - utólag - hagyományos statisztikai módszereket alkalmazva is sikerült alátámasztanunk.**

4. A heroinfüggők metadon szubsztitúciós terápiára adott válaszában genetikai faktorait vizsgálva azt kaptuk, hogy

a dopaminerg rendszer, azon belül pedig a DRD4 genetikai variánsai szerepet játszhatnak a terápia sikerességében. **Eredményeink kapcsolatot mutattak a metadon kezelésben részesülők terápiás válaszával a DAT (SLC6A3) intron 8-as és a DRD4 120 bp duplikációja, mint lehetséges rizikófaktorok esetében,** mely eredmények további megerősítésre várnak.

A metabolikus stressz indukció hatása humán fibroblasztok mRNS és mikroRNS profiljára

A fibroblaszt modell kialakításának első fázisában 17 egészséges személy bőrbioptziás mintáiból előállított primer sejtvonalak parallel mintáin mértük a különböző metabolikus stresszorok (glükózmentes, galaktózzal dúsított médium (GAL), illetve lipidcsökkentett, koleszterinmentes (RL) médium kezelés) által indukált expressziós profilváltozásokat. Eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

1. A fibroblaszt modellt alkalmazva jól mérhető stresszválaszt kaptunk az mRNS és a miRNS expressziós mintázatban. **A kétféle metabolikus stressz a teljes miRNS expressziós mintázat vonatkozásában jelentős**

hasonlóságot mutatott: a glükózmentes, galaktózzal dúsított médium (GAL) kezelésben megváltozott expressziót mutató miRNS-ek azonos irányú expresszióváltozást mutattak a lipidcsökkentett, koleszterinmentes (RL) médiummal való kezelésben is (szignifikáns korreláció: $r=0,71$; $p<0,001$). Hasonló helyzet mutatkozott a lipidcsökkentett, koleszterinmentes (RL) médiummal való kezelés során is, ahol a glükózmentes, galaktózzal dúsított médium (GAL) kezelés expressziós értékei mutattak erős korrelációt a másik stresszor expressziós változásaival ($r=0,65$; $p<0,005$).

2. Az individuális miRNS expressziós értékek közül négy miRNS (miR-129-3p, miR-146b-5p, miR-543 és a miR-550a) mutatott szignifikáns és azonos irányú változást mindkét kezelés hatására.

3. A 2. pontban említett 4 miRNS miRDB adatbázissal kapott, potenciális target mRNS-einek expressziós szintjeiben is jelentős eltéréseket kaptunk (a négy miRNS összesen 1504 db potenciális target mRNS-e közül 140 db, azaz közel 10% mutatott szignifikáns változást a metabolikus stressz kezelés hatására).

Útvonalelemzésünk alapján a fenti négy (miR-129-3p, miR-146b-5p, miR-543 és a miR-550a) miRNS targetjei biológiailag relevánsnak tűnő útvonalakban vesznek részt, úgymint: sejtciklus, apoptózis, gyulladásoos válasz és mRNS termelés, metabolikus adaptáció.

Következtetések

A munka első részében a heroinfüggőség kialakulásában esetlegesen résztvevő **genetikai polimorfizmusok asszociáció elemzését** végeztük el, amelynek eredményeképp a **DRD2 TaqIB** variáns mutatott szignifikáns asszociációt a többszörös tesztelés miatt szükségessé váló Bonferroni korrekció után is. Ez az eredmény az adott variáns heroinfüggőségben betöltött releváns szerepére utal, mely szerepet a BN-BMLA elemzés is megerősített. A szakirodalomban korábban a heroinfüggőség és a DRD2 gén asszociáció analízisével kapcsolatosan elsősorban a *TaqIA* polimorfizmusra koncentráltak, annak ellenére, hogy kiderült, hogy ez a polimorfizmus valójában nem is a DRD2-es génben, hanem a vele szomszédos ANKK1 nevű génben helyezkedik el. Ugyanakkor saját eredményeink azt mutatták, hogy **a DRD2/ANKK1 gén TaqIA polimorfizmusa nem, míg a DRD2 TaqIB polimorfizmus megtartotta a heroinfüggéssel adott szignifikáns asszociációs hatását végső relevanciaelemzésünk során is.** A konvencionális (frekvencia) kiértékelést követő Bonferroni korrekció

után a *TaqIA* nem maradt szignifikáns tényező, bár nominális szignifikanciája mind frekventista, mind pedig a BN-BMLA módszerrel kimutatható volt. **A BN-BMLA módszerrel végzett relevanciaelemzés azt is kimutatta, hogy a *TaqIA* és *TaqIB* együttes előfordulása a modellben jelentősen kisebb valószínűséggel következik be, mint a variánsok önmagukban történő előfordulása. Így a *TaqIA* *TaqIB*-hez mért elhanyagolható relevanciája a két polimorfizmus közötti redundanciának köszönhető.** Az elemzések során felhasznált BN-BMLA statisztikai módszer azon kívül, hogy alátámasztotta a hagyományos statisztikával kapott eredményeinket, további hatás kimutatására is lehetőséget adott a **-615 A/G SNP indirekt hatásának** formájában, így elmondható, hogy az alkalmazott BN-BMLA analízis az interakciók és redundanciák modellbe foglalásával szélesebb körű és szubjektivitástól mentesebb formában képes az eredmények kiértékelésére.

A dopaminerg rendszer szerepét a kezelési hatékonyság tekintetében is feltételeztük. Vizsgálatunkban a **dopamin transzporter intron 8-as és a DRD4 120 bp duplikációjának** hatása mutatott

trendszerű hatást, azonban az alacsony mintaelemszám további vizsgálatokat tesz szükségessé. Mindenesetre elmondható, hogy úgy tűnik, a függőség kialakulásáért és a kezelés hatékonyságáért (terminálásáért) nem feltétlenül ugyanazon génvariánsok felelősek.

A munka második részében a **fibroblaszt modell rendszer** vizsgálatát végeztem. A glükóz-hiányos, galaktózzal kezelt és a lipidcsökkentett, koleszterin-hiányos médiummal való kezelés erős mRNS és miRNS változásokat okozott a kezelt humán fibroblaszt sejtenyészetekben. A miRNS expresszió változások kiértékelésekor **nagyfokú hasonlóságot** figyelhettük meg **a két metabolikus stresszkezelés során**, továbbá az eredményekből úgy tűnik, hogy ezen **miRNS expresszió változások jelentősen hozzájárulnak a megváltozott mRNS expressziós képhez** mind a galaktózzal kezelt, mind a lipidcsökkentett beállításban. A két stresszor kiváltotta hasonló hatás azt engedi feltételezni, hogy a megváltozott homeosztázisra a fibroblaszt sejtek egy **általános védelmi választ** adnak. Eredményeink továbbá azt is sugallják, hogy a **miRNS-ek jelentősen hozzájárulnak az mRNS-ek szabályozásához**

metabolikus stressz fellépése esetén. Összegezve elmondható, hogy a fibroblaszt kultúrák jól ellenőrzött vizsgálatok kivitelezésére alkalmasak és könnyen hozzáférhetőek. Ez különösen fontos poligénes pszichiátriai betegségek vizsgálatakor, amikor limitált az agyszövet direkt vizsgálati hozzáférhetősége és az állati modellek nem képesek az emberi betegség megfelelő modellezésére.

Saját publikációk jegyzéke

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

1. **Vereczkei A**, Demetrovics Z, Szekely A, Sarkozy P, Antal P, Szilagyi A, Sasvari-Szekely M, Barta C. (2013) Multivariate analysis of dopaminergic gene variants as risk factors of heroin dependence. PLoS One, 8: e66592.
2. Kalman S, Garbett KA, **Vereczkei A**, Shelton RC, Korade Z, Mirnics K. (2014) Metabolic stress-induced microRNA and mRNA expression profiles of human fibroblasts. Exp Cell Res, 320: 343-353.

A disszertációtól független közlemények jegyzéke:

1. Demetrovics Z, Varga G, Szekely A, **Vereczkei A**, Csorba J, Balazs H, Hoffman K, Sasvari-Szekely M, Barta C. (2010) Association between Novelty Seeking of opiate-dependent patients and the catechol-O-methyltransferase Val(158)Met polymorphism. Compr Psychiatry, 51: 510-515.
2. Szekely A, Balota DA, Duchek JM, Nemoda Z, **Vereczkei A**, Sasvari-Szekely M. (2011) Genetic factors of reaction time performance: DRD4 7-repeat allele associated with slower responses. Genes Brain Behav, 10: 129-136.

3. Halmai Z, Dome P, **Vereczkei A**, Abdul-Rahman O, Szekely A, Gonda X, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2013) Associations between depression severity and purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms. *J Affect Disord*, 150: 104-109.

4. Gyollai A, Griffiths MD, Barta C, **Vereczkei A**, Urban R, Kun B, Kokonyei G, Szekely A, Sasvari-Szekely M, Blum K, Demetrovics Z. (2014) The genetics of problem and pathological gambling: a systematic review. *Curr Pharm Des*, 20: 3993-3999.

5. Garbett KA, **Vereczkei A**, Kalman S, Brown JA, Taylor WD, Faludi G, Korade Z, Shelton RC, Mirnics K. (2015) Coordinated messenger RNA/microRNA changes in fibroblasts of patients with major depression. *Biol Psychiatry*, 77: 256-265.