

Strokovni prispevek/Professional article

POLIMORFIZMI DOPAMINSKIH RECEPTORJEV PRI BOLNIKI S PIGMENTNO RETINOPATIJO

POLYMORPHISMS OF DOPAMINE RECEPTORS IN PATIENTS WITH RETINITIS PIGMENTOSA

Melita T. Kermavnar¹, Borut Peterlin¹, Marko Hawlina²

¹ Služba za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, Klinični center, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

² Očesna klinika, Klinični center, Zaloška 29, 1525 Ljubljana

Prispelo 2001-03-15, sprejeto 2001-05-28; ZDRAV VESTN 2002; 71: Supl. II: 147-50

Ključne besede: pigmentna retinopatija; dopaminski receptorji; polimorfizmi

Izvleček – Izhodišča. Dopamin (DA) ima pomembno vlogo pri delovanju mrežnice, obnavljanju in fagocitozi izrabljenih diskov fotoreceptorskih celic v pigmentnem epiteliju. Živalski model podgan RCS (Royal College of Surgeons) z okvarjeno fagocitozo je pokazal podobno sliko, kot jo vidimo pri bolnikih z napredovalo pigmentno retinopatijo (RP). Na podlagi raziskav na podganah in ugotovitvi, da ima DA pomembno vlogo pri obnavljanju mrežnice, sklepamo, da so nekateri polimorfizmi DA receptorjev lahko udeleženi pri nastanku RP pri človeku.

Materiali in metode. Primerjali smo skupino 65 bolnikov in 80 zdravih ljudi. Z metodo polimerazne verižne reakcije in cepitvijo z encimi DdeI (DRD1), TaqI (DRD2) in MspI (DRD3) smo določali polimorfizme dopaminskih receptorjev D1, D2 in D3 (DRD1, DRD2 in DRD3). Statistično smo primerjali tri modele izražanja alelov (kodominantni, dominantni in recesivni) s χ^2 -testom.

Rezultati. Ugotovili smo povezavo med RP in DRD2 TaqI RFLP po avtosomno recesivnem modelu izražanja (OR = 1,9 (95% CI: 1,7-2,3), $p = 0,08$). Ostali polimorfizmi in modeli izražanja niso pokazali pomembne povezave z RP.

Zaključki. Opozorili smo na možen pomen DRD2 receptorja pri patogenezi RP, vendar je treba narediti nadaljnje raziskave na večjem vzorcu bolnikov.

Uvod

Pigmentna retinopatija (RP) je fenotipsko in genotipsko heterogena genetsko pogojena bolezen. Deduje se avtosomno dominantno (adRP), avtosomno recesivno (arRP) ali vezano na kromosom x (xRP), opazujemo pa tudi veliko število sporadičnih primerov brez družinske obremenitve (1). Poznamo 30 različnih genov, katerih mutacije povzročijo RP (2), vendar obstaja znotraj vsake skupine dodatna nealelna heterogenost (3). Kljub temu da je RP monogenska bolezen, kar pomeni, da je mutacija enega gena potreben in zadosten pogoj za razvoj

Key words: retinitis pigmentosa; dopamine receptors; polymorphisms

Abstract – Background. Dopamine (DA) has a specific role in modulation of retinal function, renewal and phagocytosis of shed discs by the retinal pigment epithelium. Animal model of RCS (Royal College of Surgeons) rats which have impaired retinal phagocytosis has shown an appearance similar to the clinical picture seen in patients with advanced retinitis pigmentosa (RP). Based on RCS rats' studies and the fact that DA has an important role in retinal renewal we assume that certain DA receptor polymorphisms might play a role in pathogenesis of RP.

Materials and methods. We compared a group of 65 RP patients and 80 healthy individuals. Using PCR method and restriction with DdeI, TaqI or MspI restriction enzymes (DRD1, DRD2, DRD3 respectively) we determined the polymorphisms of DRD1, DRD2 and DRD3. Three models of expression (co-dominant, dominant, recessive) were statistically compared with χ^2 -test.

Results. We found an evidence for association between DRD2 TaqI RFLP, OR = 1.9 (95% CI: 1.7-2.3), $p = 0.08$, under autosomal recessive model of inheritance. Other models for any of the DRD polymorphisms did not show a significant association with RP.

Conclusions. A potential association was found between RP and DRD2 polymorphism. Further investigation is needed to confirm potential implication of DRD2 in the pathogenesis of RP.

bolezni, vplivajo na potek in klinično sliko tudi drugi dejavniki, med njimi verjetno tudi drugi geni, ki z osnovno boleznijo niso neposredno povezani.

Kot kandidatni sistem smo izbrali dopaminski sistem mrežnice z dopaminom (DA), ki je glavni kateholamin v mrežnici sesalcev (4) in modulira njeno delovanje ter preko součinkovanja z melatoninom uravnava obnavljanje fotoreceptorjev s sprožitvijo fagocitoze izrabljenih diskov in prilagajanje na svetlobo in temo (5). Pri človeku so DA nevroni amakrine in interpleksiformne celice v notranjem jedrnem sloju mrežnice, vendar najdemo dopaminske receptorje iz skupine D1 in D2

s podskupinami (6-14) po celotni mrežnici, od pigmentnega epitela do ganglijskih celic (5). Predpostavljamo, da imajo polimorfizmi dopaminskih receptorjev (DRD) fiziološki učinek na delovanje receptorjev in s tem na delovanje celotnega DA sistema. Polimorfizmi DRD lahko vplivajo na afiniteto vezave dopamina, zaradi česar je njegov učinek spremenjen in sproži v mrežnici neravnovesje, ki se klinično kaže kot RP. Živalski model RCS (Royal College of Surgeons) podgan z okvarjeno fagocitozo pigmentnega epitela mrežnice (RPE) je pokazal spremembe na mrežnici, podobne klinični sliki bolnikov z napredovalo RP (4). Na podlagi teh raziskav in predpostavke, da je pri RP okvarjen tudi DA sistem (6), lahko sklepamo, da so nekateri polimorfizmi DRD dejavnik, ki vpliva na razvoj bolezni.

Materiali in metode

Bolniki in kontrole

V raziskavo smo vključili skupino 65 bolnikov s klinično potrjeno RP, ki med sabo niso sorodstveno povezani, saj bi morebitne sorodstvene povezave lahko pomembno vplivale na rezultate. Klinični pregled je bil opravljen na Očesni kliniki v Ljubljani in je zajemal anamnezo, pregled očesnega ozadja in elektroretinogram (ERG). Raziskavo je odobrila tudi etična komisija.

Za kontrolno skupino smo izbrali 80 oseb, ki do 50. leta niso imeli nobenih očesnih bolezni, še posebno težav z nočnim vidom.

Genetska analiza

DNK smo izolirali iz venske krvi po standardnih postopkih (16). S polimerazno verižno reakcijo (PCR) smo pomnožili želene odseke DRD1, DRD2 in DRD3 z začetnimi oligonukleotidi, ki so bili opisani v literaturi v povezavi z drugimi boleznimi (18-21, 23, 24, 26): **3'D1.D** AGC ACA GAC CAG CGT GTT C in **5'D1** ACT GAC CCC TAT TCC CTG CT (DRD1), **5014** CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA in **971** CCG TCG ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA (DRD2), **6F** CTG TCT GGT ACA TAT TGG ATA in **7R** GAG ATG GAG TCT TGC TCT GTC (DRD3). Produkt PCR smo cepili z restrikcijskimi encimi DdeI (DRD1), TaqI (DRD2) in MspI (DRD3) pri temperaturi največje aktivnosti encimov, ter produkt reakcije prikazali na 4-odstotnem agaroznem gelu za določitev genotipov za posamezne polimorfizme DRD v skupinah bolnikov in kontrol.

Statistična obdelava podatkov

Za vsakega od dopaminskih receptorjev smo naredili tri različne genetske modele izražanja alelov, ki bi lahko bili vpleteni v patogenezo RP.

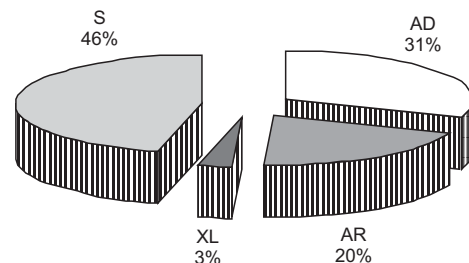
Kodominantni model (KM) upošteva enakovrednost vseh alelov. Dominantni model (DM) predpostavlja, da se bolezen izrazi v primeru, ko je prisoten vsaj en alel, ki je povezan z boleznijo; pri recisivnem modelu (RM) pa se vpliv alelov izrazi, če sta bolezenska alela prisotna v homozigotni obliki.

Z uporabo statističnega programa SPSS smo naredili χ^2 -test (SPSS, Illinois). Za statistično signifikantno vrednost smo upoštevali vrednosti $p \leq 0,05$.

Rezultati

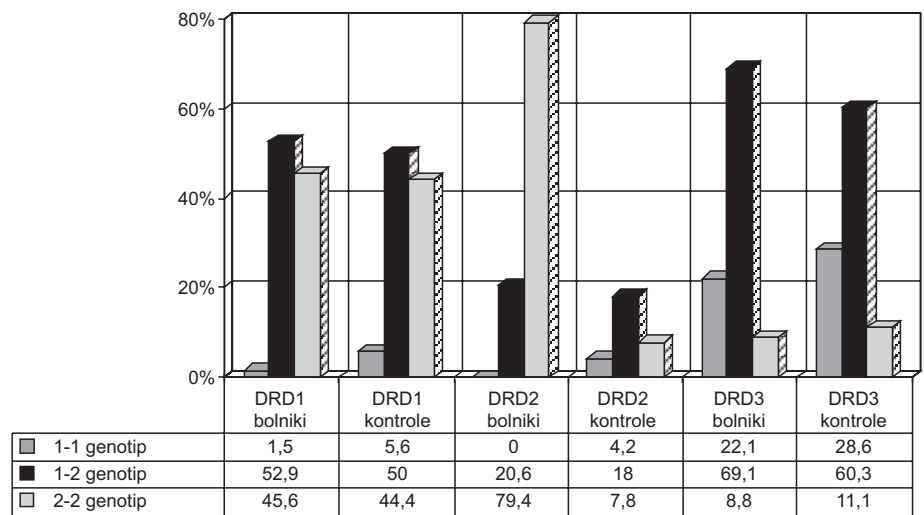
Izbrali smo skupino 65 bolnikov (36 žensk in 29 moških) z že razvito pigmentno retinopatijo v različnih stadijih bolezni. Povprečna starost bolnikov je bila 38 let, v razponu od 13 do 73 let. Vzorci dedovanja RP so bili pri posameznikih različni. Z družinsko analizo smo ugotovili 20 avtosomno dominantnih, 13 avtosomno recesivnih, 2 na kromosom X vezana in 30 sporadičnih primerov.

Primerjali smo splošno populacijo bolnikov z RP in kontrolno skupino. Za kontrolno skupino smo uporabili ljudi, ki do 50. leta niso imeli težav z nočnim vidom.



Sl. 1. V vzorcu bolnikov smo z družinsko anamnezo določili različne vzorce dedovanja RP: AD – avtosomno dominantno, AR – avtosomno recesivno, XL – vezano na kromosom x, S – sporadično.

Fig. 1. In the group of patients we determined the hereditary model of RP: AD – autosome dominant, AR – autosome recessive, XL – X-linked and S – sporadic.



Sl. 2. Razporeditev genotipov za posamezne polimorfizme DRD pri bolnikih in kontrolah. Prikazana je velika razlika pri polimorfizmu DRD2.

Fig. 2. Genotypes for different DRD polymorphisms in patients and controls. A significant difference of DRD2 polymorphism is shown.

S pomočjo molekularne genetike smo določili genotipe predstavnikov obeh skupin za izbrane polimorfizme DRD1, DRD2 in DRD3 (sl. 2). Ugotovili smo, da se v naši kontrolni skupini vsi aleli za DRD1, DRD2 in DRD3 pojavljajo enako pogosto, kot je bilo že prej opisano v literaturi (18, 20-23, 26, 27). Rezultati za posamezne modele izražanja alelov so prikazani na sl. 2 in v tab. 1, 2 in 3.

S pomočjo metode PCR in gelske elektroforeze smo določili genotipe vseh bolnikov in kontrol za polimorfizme DRD1, DRD2 in DRD3. Pri izbranih polimorfizmih za DRD1 in DRD3

Tab. 1. *Razporeditev genotipov DRD1 5'UTR DdeI polimorfizma v skupini bolnikov in kontrol. B1 – homozigot 146 bp + 61 bp; B2 – homozigot 146 bp + 42 bp + 19 bp; B1-2 – heterozigot.*

Tab. 1. *DRD1 5'UTR DdeI polymorphism genotypes in the groups of patients and controls. B1 – homozygote 146 bp + 61 bp; B2 – homozygote 146 bp + 42 bp + 19 bp; B1-2 – heterozygote.*

Model	Genotip Genotype	Bolniki Patients		Kontrole Controlls		Število No.	χ^2 -test	OR
		število no.	%	število no.	%			
KM	B1B1	1	1,5	3	5,6	4	0,451	-
	B1B2	36	52,9	27	50,0	63		
	B2B2	31	45,6	24	44,4	55		
DM	B1B1	37	54,4	30	55,6	67	0,900	0,955
	B1B2 + B2B2	31	45,6	24	44,4	55		
RM	B1B1 + B1B2	1	1,5	3	5,6	4	0,208	0,254
	B2	67	98,5	51	94,4	118		

Tab. 2. *Genotipi DRD2 TaqI RFLP. A1 – homozigot 310 bp; A2 – homozigot 180 bp + 130 bp; A1-2 – heterozigot.*

Tab. 2. *DRD2 TaqI RFLP genotypes. A1 – homozygote 310 bp; A2 – homozygote 180 bp + 130 bp; A1-2 – heterozygote.*

Model	Alel	Bolniki Patients		Kontrole Controlls		Število No.	χ^2 -test	OR
		število no.	%	število no.	%			
KM	A1A1	0	0,0	3	4,2	3	0,227	-
	A1A2	14	20,6	13	18,0	27		
	A2A2	54	79,4	56	77,8	110		
DM	A1A1 + A1A2	14	20,6	16	18,0	30	0,814	0,907
	A2A2	54	79,4	56	7,8	110		
RM	A1A1	0	0,0	3	4,2	3	0,089	1,986
	A1A1 + A1A2	68	100,0	69	95,8	137		

Tab. 3. *Genotipi DRD3 MspI RFLP. 1 – homozigot 396 bp; 2 – homozigot 252 bp + 144 bp; 1-2 – heterozigot.*

Tab. 3. *DRD3 MspI RFLP genotypes. 1 – homozygote 396 bp; 2 – homozygote 252 bp + 144 bp; 1-2 – heterozygote.*

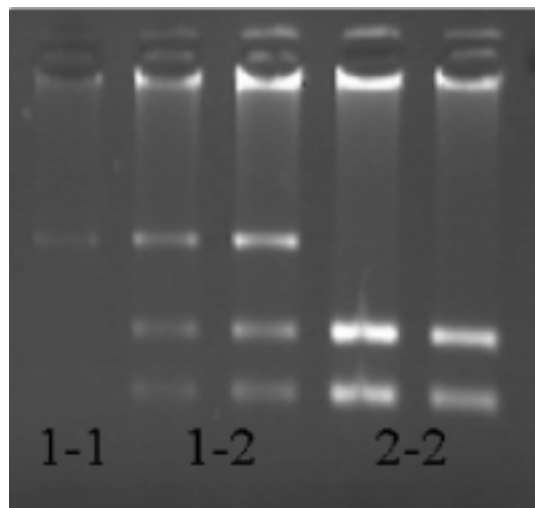
Model	Alel	Bolniki Patients		Kontrole Controlls		Število No.	χ^2 -test	OR
		število no.	%	število no.	%			
KM	C1C1	15	22,1	18	28,6	33	0,573	-
	C1C2	47	69,1	38	60,3	85		
	C2C2	6	8,8	7	11,1	13		
DM	C1C1	61	91,0	56	88,9	117	0,682	1,271
	C1C2 + C2C2	6	8,9	7	11,1	13		
RM	C1C1 + C1C2	15	22,4	18	28,6	33	0,418	0,721
	C2C2	52	77,6	45	71,4	97		

nismo ugotovili statistično pomembne razlike med skupinama za noben model izražanja (tab. 1 in tab. 3), zato lahko trdimo, da ti polimorfizmi nimajo vpliva na RP.

Pri recesivnem modelu izražanja za alel A2 TaqI RFLP DRD2 (sl. 3) smo ugotovili morebitno povezavo z boleznijo (OR = 1,9 pri 95% CI: 1,7–2,3; p = 0,08), vendar razlika ni bila statistično pomembna. Dominantni in kodominantni model izražanja pri DRD2 RFLP z RP nista povezana.

Razpravljanje

V naši raziskavi smo poskušali potrditi hipotezo, da imajo polimorfizmi dopaminskih receptorjev pomembno vlogo v pa-



Sl. 3. *Genotipi DRD2 TaqI RFLP, prikazani na 4-odstotnem agaroznem gelu. Pri genotipu 2-2 smo odkrili indikacijo za povezavo z RP. Genotip 1-1: homozigot za odsotnost restrikcijskega mesta za encim TaqI (310 bp); 2-2: homozigot za prisotnost restrikcijskega mesta (180 bp + 130 bp); 1-2: heterozigot, ki izraža vse tri fragmente.*

Fig. 3. *DRD2 TaqI RFLP genotypes presented on 4% agarose. In genotype 2-2 we found a potential association with RP. Genotype 1-1: homozygote for no restriction site for TaqI enzyme (310 bp); 2-2: homozygote for restriction site for TaqI enzyme (180 bp + 130 bp); 1-2: heterozygote – all three fragments are present.*

togenezi pigmentne retinopatije (RP). Ugotovili smo, da to ne velja za izbrane polimorfizme dopaminskih receptorjev (DRD) D1 in D3, nakazana pa je povezava med DRD2 in RP.

Kandidatni geni za vpliv na patogenezo RP so tudi geni za dopaminske receptorje (DRD), saj lahko različne oblike receptorjev spremenijo delovanje dopamina, ta pa ima pomembno vlogo pri delovanju in obnavljanju mrežnice (5). Za nastanek različnih, vendar še vedno funkcionalnih dopaminskih receptorjev je odgovoren nekoliko spremenjen genetski zapis, ki se kaže v obliki polimorfizmov. V literaturi je bilo opisanih več polimorfizmov DRD v povezavi z drugimi boleznimi, kot so na primer shizofrenija, alkoholizem, Parkinsonova bolezen, povišan krvni tlak. (18, 20, 21, 23–29), vendar raziskav o povezavi z RP še ni bilo.

Vloga dopaminskega sistema v delovanju in obnavljanju mrežnice je bila prikazana na živalskem modelu podgan RCS (Royal College of Surgeons), ki imajo okvarjeno fagocitozo izrabljenih diskov fotoreceptorskih celic v pigmentnem epiteliju mrežnice (RPE) (5). Spremembe na mrežnici podgan so bile podobne spremembam pri bolnikih z napredovalo pigmentno retinopatijo, z odlaganjem pigmenta, degeneracijo in atrofijo mrežnice. Pravi pomen dopamina ali njegovih receptorjev še ni poznan, predpostavljamo pa, da polimorfizmi DRD spremenijo afiniteto vezave dopamina, kar sproži neravnovesje v mrežnici in vpliva na razvoj bolezni.

Raziskava Bubenika in Purtilla (35) je pokazala, da bromokriptin (dopaminski D2 antagonist) upočasni degeneracijo mrežnice pri podganah RCS in izboljša ERG distrofičnih mrežnic. Ti rezultati nakazujejo, da imajo lahko dopaminski D2 antagonisti zdravilni učinek na dedno degeneracijo mrežnice pri podganah, hkrati pa se postavlja vprašanje, ali ima neravnovesje med dopaminom in melatoninom vlogo tudi pri klinično znanih degeneracijah mrežnice, kot je RP. Cavallacci s sod. je opazoval spremembe ERG pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo in bolnikih, ki so prejeli DA antagonist halo-

peridol (16). Po zdravljenju z L-DOPO se je vidno polje izboljšalo pri 30% od 487 bolnikov. Sklepajo, da je pri RP okvarjen tudi DA sistem. Degeneracije mrežnice pri podganah ne moremo enačiti z RP, nekateri avtorji pa predlagajo, da bi v zgodnjih stadijih bolezni uporabili DRD2 agoniste in antagonist melatonina (5).

Z uporabo PCR smo določili genotipe bolnikov in kontrol za izbrane polimorfizme DRD, ki imajo dokazan fiziološki učinek. V primeru, da gre za povezavo med polimorfizmi DRD1 in DRD3 ter RP, bi pričakovali različno frekvenco pojavljanja alelov v skupini bolnikov z RP, česar pa nismo našli. Rezultati so pokazali, da ne obstaja statistično pomembna razlika med bolniki in kontrolami v DRD1 DdeI in DRD3 MspI polimorfizmih za noben model, saj so aleli enakomerno razporejeni med skupinama ($p_{DM1} = 0,955$; $p_{RM1} = 0,254$; $p_{DM3} = 0,907$; $p_{RM3} = 1,986$). V nasprotju s tem pa smo opazili mogočo povezavo TaqI DRD2 polimorfizma in RP. Za recesivni model izražanja A2 alela TaqI RFLP (homozigot za prisotnost restriksijskega mesta za encim TaqI), ki je bil v literaturi opisan kot dejavnik tveganja pri shizofreniji, alkoholizmu, odvisniškem obnašanju, povišanem krvnem tlaku in nekaterih drugih boleznih (20, 21, 23, 24), smo v naši raziskavi našli verjetnost za povezavo tudi z RP (OR = 1,9; $p = 0,08$). Omeniti velja, da pri fagocitozi dopamin deluje na RPE preko DA receptorjev tipa DRD2 in ne preko receptorjev DRD1 oz. DRD3. Zato je povezanost polimorfizma DRD2 receptorjev in odsotnost polimorfizma DRD1 in DRD3 receptorjev pravzaprav v logični povezavi z možnim patogenetskim mehanizmom RP.

Za potrditev pomembnosti DRD2 polimorfizma v patogenezi RP je treba narediti dodatne raziskave na večjem vzorcu bolnikov. Kljub temu da izbrana polimorfizma DRD1 in DRD3 nista pokazala povezanosti z RP, obstaja verjetnost, da je z boleznijo povezan kateri koli drugi polimorfizem v teh receptorjih, zato bomo v prihodnosti študijo razširili na večje število polimorfizmov.

Klinični pomen raziskave o vlogi dopaminskega sistema v patogenezi RP je predvsem farmakološki. Spoznanje o mehanizmih, ki vplivajo na klinično izražanje in potek bolezni, je prvi korak do uvedbe novih načinov zdravljenja ali preprečevanja napredovanja bolezni. Z usmerjenim delovanjem zdravil na dopaminske receptorje bi lahko vplivali na potek RP ali celo na njen nastanek.

Literatura

1. RetNet (Retinal Information Network): The University of Texas Health Science Center. Houston, 1996-2000.
2. Bayes M, Goldaracena B, Martinez-Mir A et al. A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J Med Genet* 1998; 35: 141-5.
3. Bayes M, Goldaracena B, Martinez-Mir A et al. A new autosomal recessive retinitis pigmentosa locus maps on chromosome 2q31-q33. *J Med Genet* 1998; 35: 141-5.
4. Hawlina M, Ikeda H. The role of melatonin and dopamine in retinal renewal and degeneration. *Zdrav Vestn* 1993; 62: Suppl 1: 23-31.
5. Ikeda H. Mammalian retinal neurotransmitters as seen through the eyes of a neurophysiologist. *Zdrav Vestn* 1993; 62: Suppl 1: 7-16.
6. Cavallacci G, Genovesi-Ebert F, Mannini A, Marconcini C, Oliva A, Pucci G. Le basi teoriche ed i risultati clinici della terapia con L-DOPA. In: Wirth A, Cavallacci G eds. *Rilazione al LXIV congresso della Societa ophthalmologica Italiana*. Roma: Pacini Editore, 1984: 429-42.

7. Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 1990; 347: 72-6.
8. Zhou QY, Grandy DK, Thambi L et al. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 1990; 347: 76-80.
9. Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM et al. Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 1990; 347: 80-3.
10. Buzow JR, Van Tol HH, Grandy DK et al. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988; 336: 783-7.
11. Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 1989; 342: 923-6.
12. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347: 146-51.
13. Van Tol HHM, Wu CM, Guan HC et al. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 1992; 358: 149-52.
14. Keabian JW. Multiple dopamine receptors and their implications in medicine. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992; 5 (4): 514-8. Review.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis RT. *Molecular cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
16. Erlich HA. *PCR technology*. Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 1989: 7-17.
17. Cichon S, Nothen MM, Erdmann J, Propping P. Detection of four polymorphic sites in the human dopamine D1 receptor gene (DRD1). *Hum Mol Genet* 1994; 3: 209-9.
18. Noble EP, Gottschalk LA, Fallon JH, Ritchie TL, Wu JC. D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *Am J Med Genet* 1997; 74: 162-6.
19. Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2197-7.
20. Noble EP, Ozkaragoz TZ, Ritchie TL, Zhang X, Belin TR, Sparkes RS. D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality. *Am J Med Genet* 1998; 81: 257-67.
21. Blum K, Noble EP, Sheridan PJ et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 1990; 263: 2055-60.
22. Grandy DK, Litt M, Allen L et al. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 778-85.
23. Small GW, Noble EP, Matsuyama SS et al. D2 dopamine receptor A1 allele in Alzheimer disease and aging. *Arch Neurol* 1997; 54: 281-5.
24. Bierut LJ, Rice JP, Edenberg HJ et al. Family-based study of the association of the dopamine D2 receptor gene (DRD2) with habitual smoking. *Am J Med Genet* 2000; 90: 299-302.
25. Gaitonde EJ, Morris A, Sivagnanasundaram S, McKenna PJ, Hunt DM, Mollon JD. Assessment of association of D3 dopamine receptor MspI polymorphism with schizophrenia: analysis of symptom ratings, family history, age at onset, and movement disorders. *Am J Med Genet* 1996; 67: 455-8.
26. Griffon N, Crocq MA, Pilon C et al. Dopamine D3 receptor gene: organization, transcript variants, and polymorphism associated with schizophrenia. *Am J Med Genet* 1996; 67: 63-70.
27. Tomitaka M, Tomitaka S, Otuka Y et al. Association between Novelty seeking and dopamine receptor D4 (DRD4) exon III polymorphism in Japanese subjects. *Am J Med Genet* 1999; 88: 469-71.
28. Ebstein RP, Novick O, Umansky R et al. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nat Genet* 1996; 12: 78-80.
29. Ricketts MH, Hamer RM, Manowitz P, Feng F, Sage JI, Di Paola R, Menza MA. Association of long variants of the dopamine D4 receptor exon III repeat polymorphism with Parkinson's disease. *Clin Genet* 1998; 54: 33-8.
30. Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HHM, Kidd KK, Livak KJ. A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2 (6): 767-73.
31. Sommer SS, Sobell JL, Heston LL. A common exonic polymorphism in the human D5 dopamine receptor gene. *Hum Genet* 1993; 92: 633-4.
32. Gibco BRL. *Molecular biology 98-99 catalogue*. Life Technologies 1998.
33. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols*. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 3-20.
34. Bubenik GA, Purtil RA. The role of melatonin and dopamine in retinal physiology. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58: 1457-62.