Heroinfüggőség és metadon terápia: a dopaminerg polimorfizmusok lehetséges szerepe

Fibroblaszt modell alkalmazása a metabolikus stressz-kezelés expressziós hatásainak vizsgálatára

Doktori értekezés

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
2014

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék **1**

Táblázatok jegyzéke **3**

Ábrák jegyzéke **4**

1 Rövidítések jegyzéke **5**

2 Bevezetés **7**

2.1. A heroinfüggőség és rizikófaktorai 8

2.1.1. A heroinfüggőség tünetei és neurobiológiája 9

2.1.2. A heroinfüggőség pszichiátriai vonatkozásai 12

2.1.3. Környezeti rizikófaktorok 13

2.1.4. A heroinfüggőség és a dopaminerg rendszer 14

2.1.5. A heroinfüggőség genetikai rizikófaktorai 15

2.2. A metadon terápia, mint a heroinfüggőség lehetséges kezelési módja 22

2.3. Expressziós mintázat-változások vizsgálata pszichiátriai rendellenességekben 25

2.3.1. Génexpressziós mérések pszichiátriai mintákban: előnyök, hátrányok 25

2.3.2. Fibroblaszt modell használata génexpressziós mérésekhez 26

3 Célkitűzések **30**

4 Módszerek **32**

4.1. A vizsgálatban résztvevő személyek 32

4.1.1. Betegek 32

4.1.2. Kontroll személyek 33

4.2. Mintavétel 34

4.2.1. DNS mintavétel a drogfüggőség vizsgálatához 34

4.2.2. Bőrbiopsziás mintavétel a fibroblaszt kultúrák előállításához 35

4.3. DNS, RNS izolálás 36

4.4. Minták előkészítése az mRNS és miRNS expressziós vizsgálatokhoz 37

4.5. A microarray adatok elemzése 37

4.5.1. A megváltozott expressziót mutató gének azonosítása 38

4.6. Genotipizálás 40

4.6.1. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata 40

4.6.2. Egypontos nukleotid variációk vizsgálata 41

4.6.3. A DRD4 SNP-k haplotípus vizsgálata 43
4.6.4. A felhasznált PCR reakcióelegy 44
4.6.5. Elektroforézis 45
4.7. Statisztikai elemzés 46
4.7.1. Konvencionális (frekventista) elemzés 46
4.7.2. BN-BMLA elemzés 47
4.8. Hierarchikus klaszterezés 48
4.9. Irodalomkutatás 49
4.10. GSEA - Gene set enrichment analízis 49
4.11. Az mRNS találatok validálása 49
4.12. A miRNS találatok validálása 50

5 Eredmények 51

5.1. Eset-kontroll elemzés 51
5.2. Több variáns együttes hatásának elemzése 57
5.3. A szubsztitúciós terápia és a dopaminerg gének asszociáció analízise 63
5.4. Metabolikus stressz-indukálta mRNS változások 66
5.5. Metabolikus stresszre adott miRNS expressziós válasz 68
5.6. miRNS és mRNS expressziók korrelációja 75

6 Megbeszélés 76

6.1. A dopaminerg rendszer kandidáns génjei és a heroinfüggőség 76
6.2. A metadon terápia farmakogenetikai vonatkozásai 81
6.3. Expressziós mintázatok vizsgálata fibroblaszt modellben 83

7 Következtetések 87

8 Összefoglalás 89

9 Summary 90

10 Irodalomjegyzék 91

11 Saját publikációk jegyzéke 122

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények jegyzéke 122
A disszertációtól független közlemények jegyzéke 122

12 Köszönetnyilvánítás 123

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat - A pszichoaktív szerfüggőség kritériumai a DSM-IV alapján. 13
2. táblázat - Az irodalomban metadonválasszal kapcsolatba hozott genetikai rizikófaktorok. 25
3. táblázat - A fibroblaszt minták demográfiai adatai és pool-ozása a miRNome qPCR array-ekhez. 34
4. táblázat - Hosszúság polimorfizmusok genotipizálása során felhasznált primerek tulajdonságai. 40
5. táblázat - Az SNP-genotipizáláshoz felhasznált primerek és tulajdonságaik. 42
6. táblázat - A restrikciós fragmentumhossz polimorfizmusok vizsgálatához felhasznált restrikciós enzimek és felismerő helyeik. 42
7. táblázat - A DRD4 haplotípus vizsgálatához felhasznált restrikciós enzimek és felismerő helyeik. 43
8. táblázat - A DRD4 haplotípus elemzés során a -521C/T genotípusnak megfelelően alkalmazott primerek. 44
9. táblázat - A különböző polimorfizmusok esetén alkalmazott elektroforetikus beállítások. 45
10. táblázat - A dopaminerg rendszer genetikai variánsai – SNP polimorfizmusok és tulajdonságaik. 52
11. táblázat - A dopaminerg rendszer genetikai variánsai – Hosszúság polimorfizmusok és tulajdonságaik. 52
12. táblázat - Az eset-kontroll elemzés eredményeinek összefoglalása. 55
13. táblázat - A hosszúság polimorfizmusok teljes genotípuslistája csoportosítás nélkül. 56
14. táblázat - Az ANKK1 és DRD2 SNP-k haplotípus elemzésének eredményei. 58
15. táblázat - A DRD4 SNP-k haplotípus elemzésének eredményei. 59
16. táblázat - DRD4 -615 A/G és -521 C/T SNP-k kombinált hatásának elemzése klasszikus statisztikai módszerrel. 60
17. táblázat - A logisztikus regresszió többváltozós elemzése során belépő változók a 3 hónapos kezelési hatékonyság vonatkozásában. 63
18. táblázat - A kétféle stresszkezelés során megváltozott expressziót mutató mRNS-ek BioCarta adatbázison alapuló útvonalanalízise során feldúsulást mutató útvonalak. 67
19. táblázat - A két metabolikus stresszkezelés során átfedően szignifikáns expresszió változást mutató miRNS-ek. 68

20A. táblázat - Galaktóz-indukálta miRNS expressziós változások és expressziójuk lipidcsökkentett kísérleti beállításban. 69
20B. táblázat - A lipidcsökkentés-indukálta miRNS expressziós változások és expressziójuk a galaktóz médiumos kísérleti beállításban. 70

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra - A *Taq* polimorfizmusok kromoszómális elhelyezkedése. 19
2. ábra - A fibroblaszt mintákon végzett microarray vizsgálatok áttekintő folyamata. 39
3. ábra - A DRD2/ANKK1 és a DRD4 SNP-k kapcsoltsági értékei. 53
4. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés összefoglalása. 59
5. ábra - BN-BMLA többszintű relevancia elemzés modellje a relevancia értékekkel. 61
6. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés eredményeinek összefoglaló kördiagramja az interakciók és redundanciák feltüntetésével. 62
7. ábra - BN-BMLA többszintű relevancia elemzés modellje a relevancia értékekkel. 64
8. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés eredményeinek összefoglaló kördiagramja az interakciók és redundanciák feltüntetésével. 65
9. ábra - A miRNS expresszió változások korrelációja a galaktóz-kezelt miRNS-ek (A) és a lipidcsökkentett kezelésben résztvett sejtek (B) esetén. 71
10. ábra - A miRNS expresszió változások GenePattern programmal végzett kétutas hierarchikus klaszterezése során kapott dendrogram. 73
11. ábra - Expressziós és qPCR eredmények korrelációja galaktóz-kezelt (A) és lipidcsökkentett (B) kísérleti beállításban. 74

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

120 bp dup	a D4-es dopamin receptor promoter régiójában található 120 bp hosszúságú duplikáció
3'UTR VNTR	a dopamin transzporter 3' régiójában található hosszúság polimorfizmus
48 bp VNTR	a D4-es dopamin receptor gén harmadik exonjában található, 48 bp ismétlődéséből álló hosszúság polimorfizmus
-521CT SNP	a D4-es dopamin receptor promoterében a -521-es pozícióban előforduló citozin/timin csere
-615 AG SNP	a D4-es dopamin receptor promoterében a -615-os pozícióban előforduló adenin/guanin csere
-616 CG SNP	a D4-es dopamin receptor promoterében a -616-os pozícióban előforduló citozin/guanin csere
ALFRED	The ALlele FREquency Database
ALR	average logarithmic ratio, átlagos logaritmikus hányados
ANKK1	ankyrin repeat and kinase domain containing 1 gene
ASA	allele-specific amplification, allél-specifikus amplifikáció
BMI	body mass index, testtömeg index
BN-BMLA	Bayesian network based Bayesian Multilevel Analysis of relevance, Bayes háló alapú bayesi többszintű relevancia elemzés
bp	basepair, bázispár
BSA	bovine serum albumin, marha szérumalbumin
CI	konfidencia intervallum
COMT	Catechol-O-methyltransferase, Katekol-O-metiltranszferáz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, hagyományos sejttenyésztő médium
DNS RNS	dezoxiribonukleinsav, ribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleozid-trifoszfát
DRD2	D2 típusú dopamin receptor
DRD4	D4 típusú dopamin receptor
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IVth Edition, Mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyve IV. kiadás
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Kábítószer és Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja
EtBr	etidium-bromid
FBS	fetal bovine serum, fötális borjú szérum
FDR	false discovery rate, hamis találati arány
GABA	gamma-aminovajsav
HPA	hypothalamo-pituitary-adrenal axis - hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely
HWE	Hardy-Weinberg egyensúly
i.v.	intravénás
KO	knock out, génkiütött

MAF	minor allele frequency – ritkább allél előfordulása
MAM	monoacetil-morfin
miRNS	mikro ribonukleinsav
MMT	methadone-maintenance therapy, fenntartó metadon terápia
mRNS	messenger ribonukleinsav
N	esetszám
NAcc	nucleus accumbens
OR	Odds ratio, esélyhányados
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PFC	prefrontal cortex, prefrontális kéreg
PTSD	post-traumatic stress disorder, poszttraumatikus stressz szindróma
R	redundancia
RFLP	restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus
RIN	RNA Integrity Number, RNS minőségére vonatkozó integritási szám
ROS	reactive-oxygen species, reaktív oxigénszármazékok
rpm	revolutions per minute, percenkénti fordulatszám
SDS	nátrium lauril szulfát
SNP	single nucleotide variation, egypontos nukleotid variáció
TAE	10 mM Tris-acetát (pH = 8,5) és 2 mM Na_2EDTA
TE	10 mM Tris, pH=8,0; 1mM EDTA
Tm	melting temperature, olvadáspont
Tris	Trisz (hidroximetil)-aminometán
UTR	untranslated region, nem transzlálódó régió
VNTR	variable number of tandem repeats, változó számú egymás után ismétlődő régiók
VTA	ventrális tegmentális area

2 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 [1]. A drogfüggőség kialakulásának genetikai vizsgálataiban elsősorban az agyi jutalmazó rendszer, és a drogok patomechanizmusában résztvevő útvonalak kandidáns génjeit vizsgálják legelterjedtebben. 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 sejtkultúrák 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.

2.1. A HEROINFÜGGŐSÉG ÉS RIZIKÓFAKTORAI

„Le kell mondaniok, hogy jól lássanak és jól halljanak. Az érzékeket és a szerveket megrontja a gyönyör rettentő és áldott közvetítője, az ópium. Étvágy és polgári jó fáradtságérzés - ezekről is le kell mondani. A szemek gyakorta könnyeznek, a fül zúg. A tárgyak, az emberek, a betűk elmosódnak. A szavak, a hangok kaotikus zavarban bolyonganak a hallószerv géprészecskéiben."

Csáth Géza: Ópium, 1911.

Világszerte emberek milliói élnek valamilyen kábítószerrel nap mint nap és sajnos a problémás kábítószer-fogyasztás Európában egyre inkább elterjedtebb jelenség. A problémás szerhasználat az EMCDDA[1] (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Kábítószer és Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja) definíciója szerint *intravénás (i.v.) kábítószer-használatot vagy az opioidok, kokain és/vagy amfetamin tartós/rendszeres használatát* jelenti. Európában ez főként az i.v. kábítószer-használatban és opioidok használatában mutatkozik meg. Gondot jelent, hogy a problémás kábítószer-használók jelentős hányada politoxikomán (többféle drogot együttesen használó) és társadalomból kirekesztett státuszú. Emiatt a tényleges fogyasztói szám becslése nehézségekbe ütközik. A problémás kábítószer-használat Európában jelentések szerint 2-10 esetet jelent 1000 főre vonatkoztatva a 15-64 éves népesség körében[2].

A heroin az ópiátok népes csoportjába tartozik. Az ópiátok csoportját azon anyagok alkotják, amelyeket a mákból (*Papaver somniferum*) vonnak ki. Ide tartozik többek között a kodein, a heroin és a morfium. A morfiumot és a kodeint a mák szárított levéből nyerik, a heroint viszont már a morfiumból szintetizálják, ezért ez utóbbit fél-szintetikus drogként tartják számon. Fájdalomcsökkentő hatásuk miatt egy ideig használatosak voltak a gyógyászatban, manapság azonban jó részük tiltott szernek számít, elsősorban függőséget okozó hatásuk miatt.

Az EMCDDA jelentése[3] szerint a heroinhasználatban az utóbbi években általános csökkenés mutatkozott Európában, ennek ellenére Magyarországon az injektálás viszonylag

[1] Honlap: http://www.emcdda.europa.eu/
[2] EMCDDA éves jelentés 2011: A kábítószer-probléma Európában. http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2011
[3] EMCDDA, 2010.

stabil szinten maradt és továbbra is szociális és közegészségügyi problémákat okoz. Az Európai Unióban még a mai napig ez a szer tehető felelőssé a kábítószer-használattal összefüggő megbetegedések és halálozások legnagyobb részéért. Külön prevalencia becslések vannak a problémás opioid használatra. Az Európára vonatkoztatott becslések szerint 1000 főre 1-8 eset jut a 15-64 éves népesség körében, ez Magyarország esetében kevesebb mint egy főt jelent. Átlagos prevalencia az Európai Unióban és Norvégiában 3,6-4,4 eset 1000 főre vonatkoztatva, ami 2009-ben mintegy 1,3-1,4 millió problémás opioid használót jelentett. Általánosságban elmondható, hogy az európai opioid-probléma átalakulóban van: a kezelt opioid használók átlagéletkora nőtt, csökkent azonban az intravénás használók aránya. A herointól eltérő opioidokat használók és a polidroghasználók aránya azonban szintén növekvő tendenciát mutat.

2.1.1. A heroinfüggőség tünetei és neurobiológiája

2.1.1.1. A heroinfüggőség fizikai és pszichikai tünetei[4]

A heroin rendszeres használata függőség kialakulásához vezethet. A heroin ($C_{21}H_{23}NO_5$, diacetil-morfin) egy félszintetikus morfinszármazék, amely a szervezetbe kerülve morfinná alakul. Ez tehető felelőssé a kialakult hatásokért, viselkedésekért. A heroint szintetikus úton – acetilálással - morfinból állítják elő, amelyet ópiumból vagy mákszalmából vonnak ki. A morfinnal szemben a heroin hatása gyorsabban és erőteljesebben alakul ki elsősorban a szervezetbe juttatást követő gyors perifériás metabolizmusa miatt. Felszívás esetén 1–2 perc elteltével, intravénásan adva azonnal hat. Hatására megszűnik a belső feszültség, a használó önbizalma megnő és elönti az eufórikus érzés. Ebben megegyezik a morfium és a kodein hatásával. A hatás időtartama azonban jóval rövidebb. Míg az ópium vagy a morfium hatása akár tíz órán át is tarthat, addig a heroiné mindössze három órán keresztül. A legtragikusabb különbség azonban abban mutatkozik meg, hogy valamennyi ópiumszármazék közül a heroinnak van a legerősebb függőséget okozó hatása, amely a folyamatos heroin utáni vágyban nyilvánul meg mind fizikai mind pszichikai tüneteket tekintve.[5]

A rövidtávú alkalmazás során a betegek eufórikus, nyugtató hatásról számoltak be, hosszú távon alkalmazva gyorsan kialakuló fizikai függőség volt a jellemző tolerancia kalakulása mellett. Azonnali hatások között említendő a lassuló légzés és keringés, a gátlódó köhögési reflex, a beszűkülő pupilla, a csökkenő látásélesség, viszketés, kitáguló bőr alatti

[4] NIDA (National Institute on Drug Abuse) honlapról: http://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/heroin; http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/rrheroin.pdf
[5] Forrás: http://www.tamaszpont.net/index.php/ode/drogenciklopedia/69-drogenciklopedia

vérerek, ennek következményeként a felmelegedő bőr, a lassuló emésztőrendszeri működés, mely gyakran székrekedéssel párosul, időnként felléphet rosszullét, hányás. Magas dózisoknál előfordulhat eszméletvesztés, túladagolás esetén kóma, végső esetben légzésbénulás és halál [2].

Az emocionális hatások sokrétűek lehetnek. Rendszeres fogyasztók melegségérzetről, jó közérzetről, békés érzésről és megelégedettségről számolnak be. Gyakran tesznek említést mind pozitív, mind negatív élményekről, mint eufória, rosszullét, fáradtság, szédülés, koncentrálóképesség hiánya, apátia és letargia. Gyakori a magukkal szembeni undor vagy bűnösség érzete. Egyes személyek ezzel szemben energiával és erővel töltődnek fel, főként ha a szerhasználatot megelőzően ki voltak fáradva. Gyakori tünet a lebegésérzés, egyfajta állapot álom és ébrenlét határán.

2.1.1.2. A heroinfüggőség neurobiológiája

A szerhasználat során bekövetkező mezokortiko/mezolimbikus és nigrostriatális dopaminerg rendszerek direkt vagy indirekt aktivációja úgy tűnik, hogy egy általános neurobiológiai következmény [3-5]. A kezdeti dopaminerg rendszerre kifejtett hatásokon túl rövid-, illetve hosszú távú szabályozásbeli változások történnek az mRNS és fehérje szintjén a főbb neurotranszmitter rendszerekben [6-10]. Ezek a hosszú távú változások hosszabb drogmentes időszak után is megmaradhatnak, feltételezhetően szerepet játszva a krónikus függőségbe való visszaesésben.

Önadagolásos és helypreferenciás kísérleteket végeztek különböző viselkedési állatmodellekben az eufória és a jutalmazó hatás jobb megértése érdekében [11]. Helypreferenciás kísérletekben megfigyelhető, hogy hozzászoktatás után az állat szívesebben tölti idejét a droghoz kapcsolható környezetben. Molekuláris biológiai tanulmányok különböző szabályozó mechanizmusokat írtak le, amelyek a szerhasználat után a receptorok, membrán transzporterek és a velük kapcsolatos fehérjék szintjén voltak megfigyelhetőek. Génmódosítással létrehozott egértörzseket tenyésztve (receptorok, transzporterek módosítása/kiütése), ezen genetikai módosítások genetikailag ugyan kódoltak lesznek, ám a kutatott fenotípus hiánya esetén az alkalmazott drog hatása más neurobiológiai rendszerek kompenzáló hatásait tükrözhetné [12,13]. Emiatt szövet-specifikus KO (knock out, génkiütött) állatokat tenyésztettek ki [14].

A heroinfüggőség neuronális útvonalai a mezokortikolimbikus dopaminrendszer részét képezik és a ventrális tegmentális area neuronjaiból eredeztethetőek[6]. Minden szerfüggőség végső soron ezen a rendszeren, annak különböző pontjain hat. A mezolimbikus hálózat a ventrális tegmentális areából projekciókat küld limbikus struktúrákhoz, mint pl. a nucleus accumbens, az amygdala vagy a hippocampus. További projekciók futnak a prefrontális, orbitofrontális és anterioir cinguláris kéregbe. A mezolimbikus és a mezokortikális dopaminhalózat párhuzamosan működik egymással és más területekkel interakcióban, egy úgynevezett tágabb amygdalát alkot. Ez kiegészül GABAerg neuronokkal a nucleus accumbensből a VTA-ba és a prefrontális kéregbe, illetve glutamáterg projekciókkal a prefrontális kéregből a nucleus accumbensbe és a VTA-ba futóan [15,16].

Az elfogadott drog- és alkoholfüggőségben alkalmazott farmakoterápiás szerek (metadon, buprenorfin, naltrexon) is opioid receptor ligandok. Az opioid receptor mechanizmusok az alkohol jutalmazó hatásában is szerepet játszanak, bár direkt farmakológiai célpont még egyértelműen nem azonosítható. Pl. μ-opioid receptor génkiütött egereknél az alkohol csökkent jutalmazó hatást fejt ki [17]. Stressz-érzékeny agyterületek, mint a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely (HPA – hypothalamo-pituitary-adrenal) szintén szerepet játszanak a függőség kialakulásában és az esetleges gyógyulásban is [18-21].

A heroin aktív metabolitjai elsősorban a μ-opioid (μ, δ és κ) receptorok agonistáiként hatnak. Habár a heroin lipofil természeténél fogva könnyebben jut át a vér-agy gáton, mint a morfin [22], szervezetbe kerülése után gyorsan metabolizálódik először 6-monoacetil-morfinná (6-MAM), majd tovább morfinná. Ezen farmakológiai tulajdonságok alapján elmondható, hogy a heroin hatása elsősorban metabolitjai által manifesztálódik [23]. Általánosságban a morfint tartják a heroin hatás kifejeződéséért felelős metabolitnak, azonban a 6-MAM jóval korábban jelenik meg a heroin metabolikus útjában és nagyobb hatékonysággal stimulálja a μ-opioid receptorokat [24]. A heroin és metabolitjai szerepének tisztázására egér vérben, illetve agyszövetben elvégezték a koncentrációk felmérését szubkután heroin adagolása után [25]. Alacsony heroin és magas 6-MAM szinteket figyeltek meg mind vérben, mind az agyban, felthetően a heroin magas vérbeli metabolikus rátájának köszönhetően. A heroin agyi metabolizmusa jóval lassabb és feltételezhetően nem ez okozza az alacsony agyi heroin és magas 6-MAM szintet. A metabolizmus hátterében így feltehetően a heroin magas vérbeli metabolikus rátája áll, amely magas 6-MAM koncentrációhoz vezet. A

[6] Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology 2002 http://www.acnp.org/Docs/G5/CH95_1357-1366.pdf

6-MAM relatív magas vér-agy permeabilitással rendelkezik, amely így magas agyi koncentrációja révén közvetíti a szervezetbe juttatott heroin hatását.

Az aktív metabolitok az agyi μ-opioid receptorokhoz kapcsolódva (pl. substantia nigra, nucleus accumbens és ventrális tegmentális area interneuronjai) csökkentik a GABAerg gátlást a dopaminerg idegsejteken [26]. Ennek eredményeképp dopamin szabadul fel és jut a szinaptikus résbe [3,27], ahol pre- és posztszinaptikus dopaminerg receptorokkal lép kapcsolatba. Emberek esetében a stressz is fontos tényezőnek számít a drogfüggőség terén, hiszen fokozza a drog utáni vágyat. Egy tanulmányban a stressz-indukálta HPA tengely aktivitás képes volt a visszaesés előrejelzésére, így a stressz nem csak a szer utáni sóvárgást növeli, hanem független módon a visszaesés előrejelzésére is szolgál [28].

A szer hatására kialakuló eufórikus érzés nagymértékben hasonlít a természetes belső eufóriához, mely a mindennapos cselekvések során alakul ki (pl. sport, táplálkozás). A folyamat lényege, hogy a táplálkozásra vagy a szexuális aktivitásra ismételten vágyakozzunk, s így a lét-, illetve a szaporodáson keresztül a fajfenntartás biztosítva legyen. Rhesus majmoknál végeztek el egy kísérletet, melynek során a nucleus accumbens agyi területére elektródát ültettek [29], melyet az állat egy pedál segítségével működésbe hozhatott, s a használt impulzus hatására olyan érzelmi állapot alakult ki, mely felülírta a létfontosságú folyamataikat is, mint pl. a táplálkozás, s ez a fajta „örömszerzés” vált elsődlegessé, mely egyes esetekben az állat éhhalál útján bekövetkezett pusztulásához vezetett. Sajnos heroinfüggők esetében hasonló probléma alakul ki, hisz a szer utáni vágy válik elsődlegessé és minden egyéb csak másodlagos.

Nemcsak a létfenntartást szolgáló belső ingerek, mint pl. a táplálkozás, hanem kutatások szerint a különböző illatok is a limbikus rendszerben fejtik ki hatásukat. A bulbus olfactoriusban szintén dopamin szabadul fel elektromos ingerlés és kábítószer, például az ecstasy hatására [30].

2.1.2. A heroinfüggőség pszichiátriai vonatkozásai

A heroinfüggőség is egy komplex betegség, hiszen a genetikai tényezőkön kívül a környezeti faktorok is befolyásoló erővel bírnak. A kutatás során alkalmazott diagnózis felállítása a Mentális zavarok diagnosztikai és statisztikai kézikönyvének negyedik kiadása (DSM-IV - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IVth Edition, American Psychiatric Association, 1994) szerint történt, amely kézikönyv alapján a függőség a szerhasználati zavarok (*Substance Use Disorders, SUD*) kategóriájába tartozik. Ezen belül két rendellenes viselkedést különítettek el: a szertúlhasználatot, azaz abúzust (*Substance Abuse*) és a szerfüggőséget (*Substance Dependence*), melyek között a fokozati különbségek miatt

nehéz a megkülönböztetés. A szerhasználati zavarokban szerepet játszó anyagok közé tartozik az alkohol, a kokain, a marihuána, a heroin, az ecstasy, a crack, a ketamin, továbbá a koffein és a nikotin is. Ahhoz, hogy valakit a függők kategóriájába soroljanak, több tünet együttes jelenléte szükséges. A DSM-IV függőségre vonatkozó kritériumai az 1. táblázatban olvashatóak.

1. táblázat - A pszichoaktív szerfüggőség kritériumai a DSM-IV alapján.

A szer használatának maladaptív módja, mely klinikailag jelentős károsodáshoz vagy zavarhoz vezet, ami a következő tünetek formájában jelentkezhet és közülük ugyanabban a 12 hónapos időszakban legalább 3 jelen van:	
1. Tolerancia	a szer jelentősen fokozott mennyiségeinek az igénye a kívánt hatás elérése érdekében vagy
	a szer azonos adagjának folyamatos használata esetén jelentősen csökken a hatás
2. Megvonás	a szerrel kapcsolatban jellegzetes megvonásos szindróma vagy
	ugyanolyan (vagy hasonló) szer bevétele a megvonási tünetek csökkentésére vagy elkerülésére
3. A szert gyakran nagyobb adagokban vagy hosszabb ideig szedik, mint eredetileg szándékozták	
4. Állandó kívánság vagy sikertelen kísérletek a szerhasználat abbahagyására vagy kontrollálására	
5. Jelentős idő és aktivitás irányul a szer megszerzésére, a szer használatára vagy hatásaitól való megszabadulásra	
6. Fontos szociális, foglalkozási vagy rekreációs tevékenységek feladása, vagy csökkentése a szerhasználat miatt	
7. A szerhasználat folytatása olyan állandó vagy visszatérő fizikai vagy pszichológiai problémák megléte ellenére, amiről tudja, hogy valószínűleg a szerhasználat okozza vagy súlyosbítja	

A DSM 2013-as új kiadásában (DSM-V) a szertúlhasználat és függőség egy közös szerhasználati zavar kategóriát képez, melyben az enyhétől a súlyos fokozatig pontozható a betegség, ezáltal a két nehezen elkülöníthető fenotípus egy közös skálára került.

2.1.3. Környezeti rizikófaktorok

Az 1960-as évek óta, habár elszórtan, de több kutató is hangsúlyozta, hogy fontos szerepet játszik a környezet, amelyben a drogot kipróbálja valaki. Egy drámai példa erre a *3,4-metiléndioxiamfetamin (MDMA)*, amelyet főleg klubokban és partikon használnak. Vagy a *kannabisz*, ami igen elterjedt, főleg a fiatalok körében.

Mostanáig kevés információnk volt róla, hogy a környezet hogyan képes megváltoztatni a kábítószer iránti fogékonyságot. A környezet fizikai tulajdonságainak változása (pl. állatkísérletekben a ketrec alakja/mérete, az alom típusa) úgy látszik erős

hatással van a drognak a viselkedésre kifejtett hatására, azonban további kutatások szükségesek a függőséget befolyásoló környezeti tényezők vizsgálatára.

A környezet 3 főbb úton befolyásolhatja a függőséget okozó drogokra adott választ [31]. Egyrészről egy rosszabb élettapasztalatokkal rendelkező egyén sokkal könnyebben válik a drog rabjává vagy esik vissza a függőségbe (viszont más élettapasztalatok pont ellenkezőleg hatnak). Másrészt az ingerszegény környezet is hozzájárulhat a drog utáni vágy kialakulásához még hosszú, drogmentes időszak után is. A harmadik út, hogy a közvetlen környezet önmagában is befolyásolhatja az adott drog általi magatartásbeli, személyes és önjutalmazó hatást, ezáltal pedig a drog újbóli használatára sarkall.

2.1.4. A heroinfüggőség és a dopaminerg rendszer

A dopaminerg útvonalak megismerő, avagy kognitív, illetve végrehajtó, azaz exekutív folyamatok széles skáláját befolyásolják, mint pl. memória, tervezési, döntési funkciók a prefrontális kéreg aktivitása által [32], vagy jutalmazó és önmegerősítő mechanizmus a limbikus rendszer által [33]. Az önmegerősítő rendszer működéséért a DRD1, DRD2 és DRD3 dopamin receptorokat tartják felelősnek, így ez a terület erősen kutatottá vált. A dopamin receptorokat két típusba sorolják az adenilát ciklázra gyakorolt hatásuk alapján. A D1-szerű receptorok (D1-es és D5-ös) növelik, míg a D2-szerűek (D2-es, D3-as és D4-es) csökkentik az intracelluláris cAMP-szintet. Az emberi dopamin receptorok mindegyikének számos genetikai variánsa létezik, közülük a D4-es receptor (DRD4) rendelkezik a legtöbb változattal [34].

A dopaminerg rendszer kulcsszerepet tölt be az agy jutalmazó és önmegerősítő mechanizmusában [35]. A dopamin különböző drogok használata esetén szabadul fel, úgymint a nikotin, kokain, marihuána és az ópiátok. A kannabisz mellett a heroint tartják felelősnek a mezolimbikus dopamin-továbbító rendszer aktiválásáért, amelyet egy μ-opioid receptor mechanizmus vezérel. Miután a heroin morfinná alakul a szervezetben, μ-opioid receptor antagonistaként viselkedik. A ligandkötés csökkenti az interneuronokból felszabaduló GABA mennyiségét, így csökkentve annak dopaminerg neuronokra kifejtett gátló hatását. Az így létrejövő gátlás gátlásának eredményeképp megnő a szinaptikus dopaminszint és beáll az eufórikus érzés [36]. A jutalmazási rendszerben fellelhető egyedi különbségek befolyásolják a szervezet droghasználatra adott válaszát, emiatt a jutalmazási rendszerben résztvevő neurotranszmitter rendszerek – különösképpen a dopamin – genetikai variánsai a szerfüggőség kiemelt kandidáns génjeinek számítanak.

2.1.5. A heroinfüggőség genetikai rizikófaktorai

Epidemiológiai kutatások szerint a szerhasználati zavarok, úgymint heroinfüggőség vagy stimulánsok használata esetén 30-70%-ra becsülhető az öröklött faktorok aránya [37,38]. Alkoholfüggőségnél ez 50-60%-ra becsülhető [39] és kb. 50% nikotinfüggőség [40] és kannabiszhasználat [41] esetén. Az örökölhetőség, amely adott fenotípus esetén a fellelhető variancia genetikai faktorok által megmagyarázható részére utal, ikervizsgálatokból becsülhető. A genetikai faktorok azonosítása lehetővé tehetné a betegség neurobiológiájának jobb megértését. Ehhez azonban a genetikai tényezőkön kívül a környezeti tényezők és a gén-környezet interakciók vizsgálata is elengedhetetlenül szükséges. Az utóbbi évtizedek kutatásai alapján azonban elmondhatjuk, hogy még mindig rengeteg a megoldatlan kérdés ezen a területen [42]. Éppen emiatt a diagnosztikai kritériumok folyamatos pontosítása is nagyobb figyelmet kapott. A legújabb trend a klasszikus betegség kategóriák használata helyett a skálázás fontosságát hangsúlyozza, ez megfigyelhető a legújabb diagnosztikai kézikönyvek esetén is, mint pl. a 2013-ban kiadott DSM-V[7].

A lehetséges genetikai rizikófaktorok felderítésére manapság két fő módszert használnak. A már említett kandidáns gén analízis során a betegség patofiziológiájában esetlegesen szerepet játszó fehérjekódoló gének variánsait fedhetjük fel. Neurobiológiai hipotézisekre hagyatkozva a pszichiátriai betegségek leggyakrabban vizsgált kandidáns génjei a monoamin (dopamin, noradrenalin, szerotonin) receptor és transzporter gének. A másik vizsgálati módszer a teljes genom vizsgálatával, előre felállított hipotézis nélkül, specifikus kromoszóma régiókat derít fel, amelyek kapcsolatba hozhatóak a betegséggel. Kapcsoltsági vizsgálatok marker polimorfizmusokat vizsgálnak az egész genomra kiterjedően a betegséghez valószínűséggel köthető kromoszóma régiók azonosítása céljából. Egy erős genetikai hatás egy monogénes betegség esetén viszonylag könnyen detektálható, azonban komplex betegségek esetében, ahol több, kisebb hatású gén játszhat szerepet, kisebb hatékonysággal folyik a rizikófaktorok azonosítása. A genom-szintű asszociáció vizsgálat (GWAS – Genome-Wide Association Studies) a teljes genom vizsgálatok jelenleg alkalmazott módszere. Ez a módszer több ezer beteg és kontroll személy mintáinak segítségével igyekszik felderíteni a lehetséges rizikófaktorokat [43]. Mindkét módszer esetében szükségesnek látszik meta-analízisek alkalmazása a statisztikai erő növeléséhez, ugyanis az egyes vizsgálatok alacsony mintaszámukból következően önmagukban nem képeznek megfelelő bázist egy kisebb hatás kimutatásához.

[7] Forrás: http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx

Az első drog- (polidrog-) függőséget vizsgáló GWAS tanulmány kevesebb, mint 1500 SNP polimorfizmust vizsgált európai-amerikai és afroamerikai drogfüggő betegek mintáit használva [44]. A kandidáns kromoszóma régiókhoz tartozott a BDNF (brain-derived neurotrophic factor) és az ADH3 (alkohol-dehidrogenáz 3). Ekkora markerszám természetesen nem volt elegendő az egyes gének azonosítására, ezért a kutatók kromoszóma régiókra következtethettek. Ezen régiók közül néhány a korábbi kapcsoltságon alapuló genomvizsgálatok esetén is előkerült már [44-48] főként alkoholfüggőségben és természetesen néhány új lókusz is figyelmet kapott. Ezt a vonalat követve számos tanulmány született a marker SNP számot 1500-ról 1 millióra növelve [49-54].

A különböző függőségek GWAS vizsgálataiból is egyértelműen látszik, hogy a genetikai hátterek között jelentős az átfedés. Nikotinfüggőségben végzett GWAS vizsgálat eredményei [54-56] nagy átfedést mutattak 4 korábbi drogfüggőséggel kapcsolatosan végzett GWAS tanulmány eredményeivel. Metamfetamin függőségen végzett GWAS [57] esetén hasonló átfedést figyeltek meg a pozitívan asszociáló gének és egyéb drogfüggőségben végzett kutatások eredményei között. Sejtadhézióban szerepet játszó molekulák, enzimek génjei; transzkripció szabályozásban, sejtszerkezet fenntartásban résztvevő gének; RNS, DNS és fehérje módosító gének felül reprezentáltattak ezekben a kutatásokban. A CSMD1 (CUB and Sushi multiple domains 1) és a CDH13 (cadherin 13) gének is idetartoznak, amelyek a leggyakrabban azonosított gének a drogfüggőség GWAS vizsgálataiban [58]. Ezek az eredmények a függőség közös neurobiológiai hátterének hipotézisét erősítik, amely a jövőbeli kutatások egyik irányvonalát képezhetné.

Kifejezetten ópiátfüggőségben is számos kutatócsoport végzett már kapcsoltsági vizsgálatot. Egy 393 családot magában foglaló vizsgálatban 5 kromoszóma régiót azonosítottak ópiátfüggőséggel kapcsolatban [59]. Két régió a 17-es kromoszómán szignifikáns kapcsoltsági eredményt adott. Egy másik, 296 családot magában foglaló tanulmány a 14q kromoszóma régió és az ópiátfüggőség között mutatott ki kapcsolatot egy hispán populációban [60]. Han kínai populációban a 4-es és 17-es kromoszómák egyes régióival találtak kapcsolatot [61]. Egy európai-amerikai metadonkezelés alatt álló, korábban heroinfüggő populáción végzett teljes genom vizsgálatban a legerősebb asszociációt két intergenikus variáns (rs965972, rs1986513) és egy intronikus SNP (rs1714984 a miokardin génben) esetében figyelték meg [62].

Tovább szűkítve a kört, a dopaminrendszer és a heroinfüggőség [63], illetve egyéb illegális szerhasználat [49,50] között is végeztek GWAS vizsgálatokat, ám nem találtak szignifikáns SNP-fenotípus asszociációt. A dopamin receptor gének, mint genetikai markerek és a szerhasználat közti asszociáció hiánya azonban a GWAS módszer korlátait is jelezheti,

hiszen a klasszikus eset-kontroll vizsgálatokban a dopaminerg rendszer génjei a legjelentősebb kandidáns géneknek számítanak.

Neurobiológiai modellek a monoamin rendszeren belül elsősorban a jutalmazási rendszer jelentőségét hangsúlyozzák a függőséggel kapcsolatosan, ahol a mezolimbikus dopaminerg útvonalak más stimuláló és gátló neurotranszmitter rendszerekkel is interakcióba lépnek [64]. A különböző drogok ezen rendszer különböző pontjain hatnak, ám végeredményként ugyanaz az emelkedett dopaminszint figyelhető meg a nucleus accumbensben [64-66].

A heroinfüggőség kialakulásával kapcsolatban felmerülő lehetséges rizikófaktorok között több géncsalád résztvevőit is megtaláljuk. Az első nagyobb csoportba az opioid rendszer génjei, ezen belül is elsősorban az opioid receptorok génjei tartoznak, melyek közül talán a legfontosabb a μ-opioid receptor. Ez egy G-protein kapcsolt receptor, amely mind a morfin, a heroin és a metadon molekuláris célpontja, fontos szerepet játszva az opioid tolerancia és függőség kialakulásában. Korábbi tanulmányok pozitív asszociációt mutattak ki a gén 1-es exonjában található rs1799971 (Asn40Asp) SNP és az ópiátfüggőség között különböző populációkban [67-69], habár más kutatásokban nem találtak asszociációt a betegséggel [70-74]. Ebbe a csoportba tartozik még a prodinorfin (PDYN) gén. Az általa kódolt fehérje endogén opioid peptidek (neoendorfin, dinorfin, leu-morfin) prekurzora, amelyek a kappa-opioid receptorokhoz kötődnek nagy affinitással. A gén polimorfizmusai elsősorban kokainfüggőséggel mutattak asszociációt [75,76]. A HPA tengely génjei közül kiemelendő a melanokortin receptor 2-es típusa (MC2R – Melanocortin receptor type 2). Számos fizikai és pszichológiai esetben, mint a PTSD (posttraumatic stress disorder, poszttraumás stressz szindróma) [77], az Alzheimer-kór [78], a major depresszió vagy különböző stresszorok [79,80], a HPA tengely nem megfelelő működését figyelték meg. MC2R SNP-k sorát és haplotípus kombinációikat vizsgálták heroinfüggőséggel kapcsolatban [81], melynek során az rs2186944 SNP és 4 SNP haplotípus kombinációja bizonyult védőfaktornak a heroinfüggőség kialakulásával szemben.

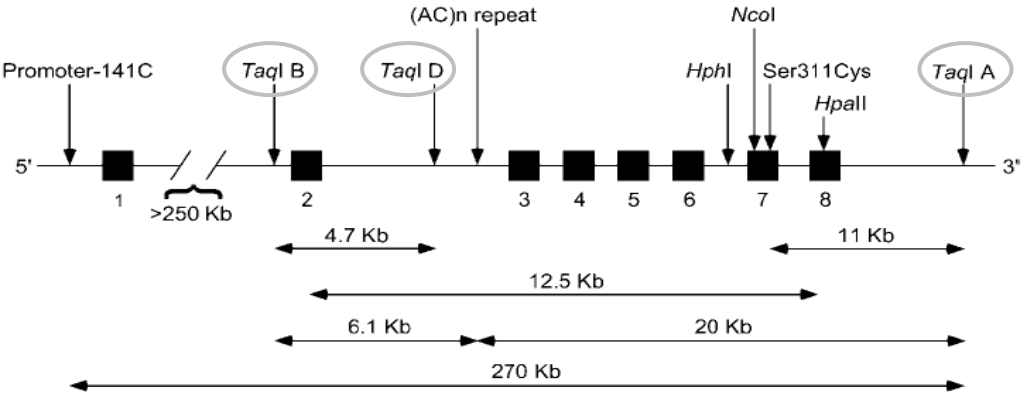
A következő és számunkra legfontosabb géncsoport a dopamin és szerotonin útvonalak génjei, amelyek közül az általunk vizsgált kandidáns gének is kikerültek. Az agy legtöbb dopaminerg neuronja a mezenkefalonból ered és fut tovább az agy különböző területeire. Ezek a projekciók 3 fő útvonalba rendeződnek [82]: 1) mezostriatális; 2) mezolimbikus; 3) mezokortikális. A mezostriatális a motoros kontrollért felelős, zavara esetén a motoros mozgás sérül, pl. Parkinson-kór esetén [83]. A mezolimbikus dopaminerg rendszer szerepe elsősorban a motivált viselkedések szabályozásában nyilvánul meg, ide tartozik a jutalomkereső viselkedés is. Ezen rendszer zavara többek között depresszió, skizofrénia és

szerhasználati zavar esetén figyelhető meg [84]. A mezokortikális dopaminerg idegsejtek befolyásolják többek között a munkamemóriát (rövidtávú memórián alapuló tervezési, célirányos viselkedések) és a kognitív alkalmazkodó-képességet [85,86]. A kortikális régió D2-es és D4-es receptorai a kognitív rugalmasság és a döntéshozó képesség esetén merültek fel, mint lehetséges szabályozók [32,86]. Szintén a dopamin-szerotonin útvonalhoz tartozik a triptofán-hidroxiláz (TPH), melyről korábban azt gondolták, hogy egyetlen gén kódolja, azonban 2003-ban leírtak egy izoenzimet (TPH2) kódoló gént [87]. Mivel a TPH asszociációt mutatott alkoholfüggőséggel [88], feltételezhető volt, hogy a TPH2 is asszociációt mutat függőséggel, amely heroinfüggőséggel kapcsolatosan be is bizonyosodott [89]. A szerotonin bioszintézisben vagy neurotranszmisszióban résztvevő gének közül további gének is asszociáltak különböző függőségekkel. A szerotonin receptorok, mint az 5-HT2A [90-92] és 5-HT1B [93] asszociációt mutattak szerfüggőséggel. A metabolizáló enzimek közé tartozó monoamino-oxidáz A (MAO-A) drogfüggőséggel [94], míg a szerotonin transzporter (5-HTR) ismétlődő polimorfizmusa heroinfüggőséggel [95,96] és alkoholizmussal [97-100] mutatott szignifikáns asszociációt.

A kandidáns gének vizsgálata során leggyakrabban kutatott genetikai polimorfizmusok a változó számú tandem ismétlődések, avagy VNTR-ek (variable number of tandem repeats) és az egypontos nukleotid variációk, avagy SNP-k (single nucleotide polymorphisms). Az általunk vizsgált dopaminerg polimorfizmusokat az alábbiakban ismertetem.

2.1.5.1. A dopamin D2-es receptor

A dopamin receptorok a G-protein kapcsolt receptor család tagjai közé tartozó makromolekulák. A D2 receptorokat kifejezett figyelem övezi, mivel nagy affinitással és specificitással kötik a gyógyászatban is alkalmazott antipszichotikus drogokat. Az emlős központi idegrendszerben fontos szerepet tölt be a dopamin, mint neurotranszmitter, mivel olyan folyamatokért felelős, mint a motiváció, az érzelmi stabilitás vagy pl. az agyalapi peptidszekréció szabályozása. E sokrétű feladatok ellátására két dopamin receptor specializálódott: a D1 és D2, melyek ligandspecificitásuk és a G-protein-mediált másodlagos hírvivő rendszerekre való hatásaik alapján különíthetők el. A DRD2 gént rengeteg fenotípussal hozták kapcsolatba, úgy mint a skizofrénia, az alkoholizmus, az ADHD, a depresszió és a heroinfüggőség.



1. ábra - A *Taq* polimorfizmusok kromoszómális elhelyezkedése[8].

A dopaminerg rendszer genetikai polimorfizmusai közé tartoznak többek között a receptorok, transzporterek, metabolizáló enzimek egypontos nukleotid variációi (SNP – single nucleotide polymorphism) és hosszúság polimorfizmusai (VNTR – variable number of tandem repeats). Az egyik legbehatóbban vizsgált kandidáns gén a dopamin D2-es receptor génje (DRD2), melynek egyik kandidáns régiójában korábban három SNP-t vizsgáltak (*Taq*IA, *Taq*IB, *Taq*ID) ezen régió *Taq*I enzimmel történő restrikciós hasítása során. Az első vizsgálatok a *Taq*IA polimorfizmus A1 (ritka) alléljának szerepét hangsúlyozták szerfüggőségben: alkoholizmusban [101] és heroinfüggőségben [102]. Az eredmények replikálása nem minden esetben volt sikeres [103,104]. 2004-ben fény derült arra, hogy a *Taq*IA restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus, avagy RFLP (restriction fragment length polymorphism) valójában a DRD2 gén előtt található ANKK1 (ankyrin repeat and kinase domain containing 1) nevezetű szerin-treonin kináz gén 8-as exonjában helyezkedik el 10 kilobázis távolságra a DRD2 géntől [105]. A *Taq*IA SNP az ANKK1-en belül egy aminosavcserét okoz (Glu713Lys), amely úgy tűnik, hogy a szubsztrátkötés sajátosságát szignifikáns módon befolyásolja. Az ANKK1 gén fehérjetermékét, mint az NF-κB (Nuclear Factor-KappaB) transzkripciós faktor negatív szabályozóját írták le [106]. AZ ANKK1 fehérjét nemrégiben humán asztrocitákban és egér gliasejtekben is detektálták, egy tanulmány a DRD2/ANKK1 interakcióját és ezeknek agyfejlődésben betöltött esetleges szerepét hangsúlyozta [107].

Az NF-κB által szabályozott gének expresszió szintjét a *Taq*IA variánsainak függvényében vizsgálták in vitro luciferáz rendszerben, és összefüggést találtak a variáns jelenléte és az expressziószintje között [108]. Mivel a DRD2 gén expressziója is egy NF-κB által szabályozott mechanizmus [109,110], feltételezhető, hogy az ANKK1 variáns indirekt befolyásolja a DRD2 receptor sűrűségét. Független tanulmányok csökkent D2 receptor

[8] Forrás: SE – Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, belső prezentációs anyag (drd2.ppt)

sűrűséget mutattak ki a ritkább allélt hordozók körében [104]. Mindemellett a *Taq*IA a *Taq*IB SNP-vel is kapcsoltságban van, amely szintén a striatális dopaminreceptor sűrűséggel hozható kapcsolatba. A *Taq*IB ritkább allélja (amely a *Taq*IA ritkább alléljával kapcsolt) ismételt vizsgálatokban is asszociációt mutatott alacsony D2 receptordenzitással [111,112]. Az is lehetségesnek látszik, hogy maga a *Taq*IA SNP mindössze markere más, függőségben funkcionálisan ható dopamin D2-es variánsnak, mint pl. a *Taq*IA-hoz szorosan kapcsolt *Taq*IB polimorfizmusnak [113].

Egy másik érdekes hipotézis kifejezetten a dopamin receptorok sűrűség csökkenésén alapszik, mely hipotézis a „Jutalomhiányos szindróma" (Reward Deficiency Syndrome) leírásával együtt jelent meg [64]. Jól ismert tény, hogy alapesetben a dopamin felszabadulásakor a szinaptikus résbe kerül, ott dopamin receptorokhoz kötődik és stresszcsökkentő, eufórikus hatást vált ki. A "Jutalomhiányos szindróma" alacsonyabb nyugalmi dopaminszinttel jellemezhető az elégtelen receptor sűrűségnek, illetve a szignálút csökkent érzékenységének köszönhetően, melynek következtében az eufórikus érzés kialakulásához adott mennyiségű dopaminra van szükség. Ez elérhető mind drogok vagy alkohol fogyasztásával, mind egyéb örömérzetet okozó cselekvésekkel, mint pl. a szerencsejáték vagy akár a sport. Állatokon végzett kísérletek szintén alátámasztják a DRD2 drogfüggőségben betöltött szerepét, mivel a D2-es receptort nélkülöző knock-out (KO) egerekben elmaradt az ópiátok okozta jutalmazó hatás [114,115].

2.1.5.2. A dopamin D4-es receptor

A legkutatottabb gének közé tartozik a dopamin D4-es (DRD4) receptor gén is. Kábítószer-függőséggel kapcsolatos vizsgálatát indokolja, hogy a DRD4 gén polimorfizmusai összefüggenek olyan, a kábítószerfüggőknél gyakran előforduló és a kábítószer-függőségre hajlamosító jelenségekkel, mint az újdonságkeresés vagy a gyermekkori figyelemhiányos hiperaktivitási zavar (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD). Ezen polimorf dopamin receptor több mint 200 SNP-vel és jónéhány VNTR-rel rendelkezik. A 48 bázispáros (bp) ismétlődést tartalmazó hosszúság polimorfizmus egy exonikus variáns, mely a receptor harmadik intracelluláris hurkának méretét változtatja és ezáltal feltehetően a jelátvitel hatékonyságát is befolyásolja [116]. Ezen variáns 7-es ismétlődést tartalmazó allélja úgy tűnik, hogy csökkent érzékenységet mutat a dopamin iránt a 4-es ismétlődést tartalmazó allélhoz viszonyítva [117] és újabb keletű neurobiológiai eredmények szerint nem képez a striatumban heteromereket a D2 receptorokkal [118].

A DRD4 gén túlnyomórészt a prefrontális kéregben expresszálódik, ám pszichiátriai genetikában is a gyakran kutatott gének közé tartozik. A 48 bp VNTR génexpresszióban betöltött szerepét feltételezte egy tanulmány, amelyben a 7-es ismétlődés csökkent RNS stabilitással járt együtt in vitro körülmények között [119].

A DRD4 gén promoterében található egy 120 bp hosszú szakasz, amely egyszer vagy kétszer ismétlődhet. A 120 bp VNTR in vitro vizsgálata azt mutatta ki, hogy a duplikált forma alacsonyabb transzkripciós aktivitással bír az egyszeres ismétlődésű formához viszonyítva [120].

2.1.5.3. A katekol-O-metiltranszferáz

A katekol-O-metiltranszferáz (COMT) gén a 22-es kromoszómán helyezkedik el (22q11) és a dopamin centrális és perifériális katabolizmusáért felelős, ezáltal fontos szerepet játszik a szinaptikus dopaminszint szabályozásában. A Val158Met exonikus SNP (rs4680), amely a 4-es exonban található és egy aminosavcserét okoz, a kutatások szerint az enzimaktivitást befolyásolja [121]: a katekolaminok, köztük a dopamin lebontása 3-4-szer gyorsabb a Val allél (nagy aktivitású forma) esetében, mint a Met allélnál (alacsony aktivitású forma). Ezen polimorfizmus ezáltal lehetséges markere vagy rizikófaktora lehet a függőség kialakulásának [122].

A COMT enzim kortikális előfordulása miatt elsőszámú kandidáns génje a neuropszichiátriai kutatásoknak. Két izoformája létezik, egy hosszabb, membránkötött és egy rövidebb, szolubilis forma, mely 50 további aminosavat tartalmaz és egy hidrofób, membránon átívelő régiót képez. A membránkötött forma elsősorban az agyban expresszálódik [123,124]. Egy humán-specifikus A/G SNP (rs4680) a membránkötött forma 158. kodonjában egy valin-metionin cserét okoz. A metioninos változat (A allél) 37°C-on gyengébb stabilitást mutat, amely egy 20-25%-os enzimaktivitás csökkenésben mutatkozik meg a Val variánshoz viszonyítva (G allél) [125-127]. Szignifikánsan alacsonyabb fehérjeszintet és 30-40%-kal alacsonyabb enzimaktivitást figyeltek meg posztmortem prefrontális kérgi (PFC) szövetekben és limfocitákban a Met/Met homozigóták esetében a Val/Val genotípushoz viszonyítva, miközben a heterozigóták közepes aktivitást mutattak [127]. Mivel a COMT az egyik legmeghatározóbb dopamin működést befolyásoló enzim a prefrontális kéregben [128], a Val158Met polimorfizmus szignifikáns különbségeket okozhatna a kortikális dopaminszintben. A korábbi elméletre támaszkodva ez a Met/Met homozigóták esetében egy magas dopaminszintet jelentene a PFC-ben a másik két genotípushoz viszonyítva, és ez lenne az optimális szint a kognitív funkciók kivitelezéséhez

normál körülmények között [129]. A Met homozigóták esetében jobb teljesítményt értek el a PFC funkciókban [130], amfetamin kezelés után azonban valószínűleg a túl magas dopaminszint miatt a kognitív funkciók csökkentek, míg ugyanez a kezelés a Val homozigóták esetében teljesítmény-növelőként hatott [131], így feltételezhető, hogy a különböző COMT genotípusok kognitív funkcióra kifejtett hatása az aktuális dopaminszinttől is függ a PFC-ben.

2.1.5.4. A dopamin transzporter

A dopamin-transzporter gén (DAT, DAT1 vagy SCL6A3) az 5-ös kromoszómán helyezkedik el (5p15.3). A dopamin szinaptikus résből való visszavételéért felelős a középagyi dopamin neuronokban [132], ezáltal egy homeosztatikus szabályozást tartva fent a dopaminerg neurotranszmisszióban. Genetikai variánsait korábban már kapcsolatba hozták különböző humán mentális betegségekkel, úgy mint a parkinzonizmus, a Tourette-szindróma és a szerfüggőség [133]. A DAT gén 8-as intron polimorfizmusával kapcsolatban végeztek asszociáció vizsgálatot, s eredményként szignifikáns kapcsolatot találtak a kokainfüggőség és a DAT polimorfizmusa között [134]. A 3' VNTR polimorfizmust többek között az ADHD-val [135] és az alkoholizmussal [136] hozták kapcsolatba és szignifikáns összefüggést találtak. Heroinfüggőséggel kapcsolatban ez idáig viszonylag kevés esetben vizsgálták és szignifikáns eredményt nem kaptak [137].

2.2. A METADON TERÁPIA, MINT A HEROINFÜGGŐSÉG LEHETSÉGES KEZELÉSI MÓDJA

A metadont (6-dimetilamino-4,4-difenil-heptán-3-on) Max Bockmühl és Gustav Ehrhart német kutatók állították elő először 1937-ben. Mivel eredményesen csökkentette a drogéhséget, a heroin megvonásakor keletkező súlyos tüneteket az átlagos heroin dózis euforizáló hatását blokkolva, ezért elvonókúrák során kezdték alkalmazni (Dole-Nyswander módszer) [138]. Heroinfüggők kezelésére először a 60-as években használták a metadont az Egyesült Államokban, ezt követően vált világszerte elterjedtté. Magyarországon 1993-ban engedélyezték hivatalosan is a metadontartalmú gyógyszerek használatát ópiát-függőség esetén, s azóta is évről-évre nőtt a kezelésbe vont betegek száma.

A kezelésnek két típusát különböztetjük meg: a metadon-detoxikációt és a szubsztitúciós, fenntartó kezelést. A detoxikáció lényege, hogy a beteget először ópiátokról metadonra állítjuk át (hosszabb távú hatás), majd az alkalmazott metadon adagot 1-6 hónapon

át folyamatosan csökkentjük, végül pedig elhagyjuk. A szubsztitúciós kezelés évekig is eltarhat, a terápiát folytató intézményben időszakonként absztinenciát célzó kezelést ajánlanak fel a programban résztvevőnek. A programba bekerülésnek több kritériuma is van:

- több-éves (legalább 2 év), igazolt ópiátfüggőségi múlt;
- 18 éven felüli életkor;
- sikertelen próbálkozás absztinenciát célul kitűző kezelési programban.

Terápiás alkalmazása során 3 különböző kezelési típust különböztetünk meg:

1) rövid távú detoxikációs kezelés: a kezelés időtartama maximum 30 nap és célja az ópiátmentesség minél előbbi elérése, a detoxikáció.
2) hosszú távú detoxikációs kezelés: a kezelés időtartama 1-6 hónapig terjed, lassabb ütemű, de a cél továbbra is az ópiátmentesség elérése. Fokozatos, lassúbb ritmusú kezelés, általában a hosszú ópiát használati múlttal rendelkező betegeknél használják.
3) hosszú távú szubsztitúciós, fenntartó kezelés: a metadon adag hosszú ideig nem változik a kezelés során a sorozatos visszaesések miatt. A kezelés akár évekig is eltarthat. Elsősorban olyan betegeknél használják, akiknél az ópiátmentesség nem érhető el belátható időn belül.

A metadon dózis meghatározása egyénenként változik. A kívánt szubsztitúciós hatás eléréséhez szükséges dózistartomány tapasztalatok alapján 60-120 mg/nap [138,139].

A helyettesítő terápiára vonatkozó felmérések szerint 2009-ben 29 európai országban a kezelésre jelentkező kábítószer-használók mintegy 51%-a, kb. 216 000 fő nevezte meg az opioidokat, főként a heroint elsődleges szerként (országonként nagy különbségek vannak: Horvátországban a kezeltek több, mint 80%-a; Magyarországon kevesebb, mint a kliensek 20%-a opioid használó). Emellett további 30 000, egyéb kábítószert fogyasztó szerhasználó (drogfogyasztó kliensek 9%-a) jelölte meg az opioidokat másodlagos szerként[9]. Néhány áttekintő adat a kezelésbe vonottakról: az opioid használó kliensek közel fele saját bevallása szerint 20 éves kora előtt használta először a kábítószert. Az első használat és az első kezelés között átlagosan 9 év telik el (nőknél valamivel kevesebb, 7 év). Európában a kezelésre jelentkező opioid használók 40%-a nevezte meg az intravénás használatot szokásos alkalmazási módként, a maradék 60% állítása szerint szippantja, belélegzi vagy elszívja a szert. A 2004-2009 közötti időszakban összességében nőtt a speciális kezelésre jelentkezők száma Európában (123 000-ről 143 000-re), ám ez a növekedés főként az ismételt kezelésre

[9] 2011. évi statisztikai közlöny járóbeteg- és fekvőbeteg-ellátó központokból származó adatai alapján.

jelentkezőknek köszönhető[10]. A helyettesítő kezelés alatt állók számát összevetve a problémás opioid használók becsült számával az is megfigyelhető, hogy a lefedettség Európán belül sem egyenletes, Magyarországon 32%.

A heroinfüggő viselkedés jobb megértése döntő fontosságú lehet ennek a mentális betegségnek a megelőzésében és kezelésében is. Az ópiátfüggők kezelésére már mintegy 30 éve alkalmazzák a metadont, ami egy teljes μ-opioid agonista és egy gyenge NMDA receptor antagonista, és amelyet heroin és más ópiátfüggőségek hosszú távú kezelésére alkalmaznak [140-142]. A farmakogenetika egyik célja egy személyre szabott terápia kialakítása az egyének drogválaszbeli varianciáját is figyelembe véve. Ha meg tudnánk jósolni az egyéni metadon-érzékenységet, egy sokkal hatásosabb metadondózis beállítására nyílna lehetőségünk. A genetikai faktorok nem csak a drogfüggőségre való hajlam becslésére szolgálnak, hanem az egyénenként változó kezelési hatékonyságra is magyarázatot adhatnak, amely többek között jelen kutatásunk célkitűzéseinek egyike is egyben.

A metadon fenntartó terápia a mai napig a leghatékonyabb kezelés ópiátfüggőségben. A legtöbb kezelésen átesetteken elvégzett vizsgálat a szerhasználat csökkenését és más pszichoszociális tényezők, mint bűnözés, rizikóvállaló viselkedés csökkenését mutatták [143,144]. Ennek ellenére a kezelt betegek körében igen gyakori a perzisztáló droghasználat. A kezelés hatékonyságának folyamatos javítása ellenére a betegek egy csoportja nem, vagy gyengén reagál a kezelésre. Ugyan nem sikerült a gyenge kezelési kimenetelt befolyásoló tényezők azonosítása, viszont néhány tanulmány ígéretes változókat talált, amelyek a pozitív kimenetelt befolyásolhatják. Ide tartozik a magasabb metadondózis esetén megfigyelhető tiltott szerhasználat csökkenése, illetve a kezelésben töltött idő megnyúlása [145,146], de sajnos önmagában a dózis növelése sem garantálja a pozitív kimenetelt. Jelentős irodalom mutatja, hogy a polidrog használat súlyosan veszélyezteti a kezelés pozitív kimenetelét. Pl. a kokain/crack használata a folytatólagos heroinhasználat egyik rizikófaktora [147,148]. Habár irodalmi adatok azt mutatják, hogy azok a betegek, akik függőségük mellett mentális betegségben is szenvednek gyengébb kezelési eredményt mutatnak, kevés tanulmány készült a mentális betegségek ópiátfüggőség kezelésére gyakorolt hatásáról [149,150].

Annak ellenére, hogy a heroinfüggőség és a metadon kezelés hatékonyságának vizsgálata tekintetében nincs még standard vizsgálati módszer, az nyilvánvaló, hogy a kezelésre adott válasz egyéni mivolta személyre szabott terápia kidolgozását teszi szükségessé. Az egyéni variabilitásba pedig a genetikai faktorok variabilitása is beletartozik, hiszen ezen tényezők nem csak a drogfüggőségre való hajlamot, de a kezelés kimenetelét is befolyásolhatják. A metadon terápiára adott választ befolyásoló genetikai tényezők kutatása

[10] 2011. évi statisztikai közlöny adatai alapján.

több fronton is zajlik, számos gén került azonosításra az elmúlt években, melyeket az alábbi táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat - Az irodalomban metadonválasszal kapcsolatba hozott genetikai rizikófaktorok.

Génazonosító	Gén név
ABCB1 [151,152]	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
ARRB2 [153]	beta-arrestin 2
BDNF [154]	brain-derived neurotrophic factor
CYP2B6 [151,155]	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
CYP2D6 [156]	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6
DRD2/ANKK1 [151,157,158]	dopamine receptor D2/ankyrin repeat and kinase domain containing 1
GRM6 [159]	metabotropic glutamate receptor 6
KCNJ6 [160]	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6
MYOCD [159]	myocardin
NGFB [161]	nerve growth factor (beta polypeptide)
OPRM1 [151]	mu opioid receptor 1

Jelen munkám során a függőségre hajlamosító tényezők között is vizsgált dopaminerg gének és a metadon kezelésre adott válasz közti asszociációt vizsgáltam specifikusan.

2.3. EXPRESSZIÓS MINTÁZAT-VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA PSZICHIÁTRIAI RENDELLENESSÉGEKBEN

2.3.1. Génexpressziós mérések pszichiátriai mintákban: előnyök, hátrányok

A klasszikus genetikai asszociáció vizsgálatok mellett az utóbbi évtizedben egyre inkább elterjedtek a microarray technológián alapuló génexpressziós vizsgálatok, amelyek ígéretes módszernek bizonyultak komplex betegségek vizsgálatánál is, ahol lehetőség nyílt több ezer variáns génexpressziós szintjének egyidejű vizsgálatára, ezáltal a komplex hatás jobb megismerésére és mindezt akár előzetes hipotézis nélkül. Pszichiátriai betegségek esetén génexpressziós mérések elvégzéséhez a legrelevánsabb szövet az agyszövet. Ennek közvetlen vizsgálatára azonban csak posztmortem, illetve nagyon ritkán idegsebészeti műtéti anyagból van lehetőség. A legtöbb, pszichiátriai betegektől származó posztmortem agyminta feldolgozásából származó eredmény skizofréniával [162-167], major depresszióval [168-173] kapcsolatosan került publikálásra, mások skizofrénia és bipoláris betegséget együttesen vizsgálták [174,175], míg néhány tanulmány magára a bipoláris betegségre fókuszált [162,176-180].

Természetesen a microarray technológiának is megvannak az előnyei, hátrányai. Nagy előnye, hogy kevésbé szubjektív és hipotézis-irányított módszer, mint a kandidáns gén analízis és egyszerre több ezer transzkriptum expressziójának vizsgálatára képes. Másrészről viszont több fontos tényező is befolyásolja a vizsgálat kimenetelét, amelyekre szigorúan kell ügyelni. Posztmortem minták esetén ide tartoznak pl. a halál körülményei (halál oka, esetlegesen használt drogok, gyógyszerek a szervezetben, elnyújtott haldoklási idő); a minták kezelése (posztmortem intervallum, mintafeldolgozás); minta minősége (pH, RNS integritás) és az adatok feldolgozása. Természetesen ezekhez a technológiákhoz hozzátartozik egy statisztikai módszer is a fals pozitív és negatív találatok minimalizálására, amely a többszörös tesztelésből adódik. A legáltalánosabban elfogadott módszerek a változás arányának számolása (FC – fold change), a p-érték meghatározás, illetve a hamis találati arány (FDR – false discovery rate) használata.

2.3.2. Fibroblaszt modell használata génexpressziós mérésekhez

2.3.2.1. A fibroblaszt sejtek használatának előnyei

Humán agyszövetekkel dolgozni, elsősorban a szövetek limitált hozzáférhetősége miatt igen bonyolult módszer. Az expresszió vizsgálatok kivitelezésénél és replikálásánál is felvetődnek különböző nehézségek: 1) melyik agyterületet lenne legcélszerűbb vizsgálni; 2) problémát okozhat-e az agyszöveti sejtek heterogenitása; 3) megbízhatóak-e az eredmények a relatíve kis mintaelemszám esetén; 4) milyen hatása van a halálnak és a halál utáni mintakezelésnek a szöveti expresszióra? Hogy ezen problémák egy részét kiköszöbölhessük, jónéhány kutatócsoporttal egyetemben [181,182] vizsgálatunkban bőrbiopsziából származó fibroblaszt kultúrákat használtunk. Ezen kultúrák jól használható modellnek bizonyultak számos humán betegség esetében, beleértve az affektív zavarokat is [183,184]. További előnyük, hogy a kultúrák viszonylag egyszerűen létrehozhatóak, reprodukálhatóak és kultúrában tarthatóak ellenőrzött körülmények között, külső faktorok kizárásával.

Pszichiátriai betegeken végzett posztmortem agyi szövettani vizsgálatok esetén mind az mRNS mind a miRNS transzkriptom változások detektálhatóak [185,186]. Természetesen ezen változások pontos molekuláris hátterét, mikéntjét és következményeit nem ismerjük részleteiben. Mivel sok pszichiátriai betegség esetén egyértelműen használható állatmodellek nem állnak rendelkezésre [187,188], az effajta betegségek előfordulási aránya és súlyossága miatt szükség van a betegség hátterének alaposabb megértésére, amihez elengedhetetlen a szöveti szintű vizsgálat. In vitro modellről azonban posztmortem minták lévén nem beszélhetünk. Az agyi minták nyugvó állapotok mérésére alkalmasak, így génexpressziós

vizsgálatok kivitelezésénél előnyös a használatuk. A fibroblasztok azonban hozzáférhetőségüknél, nagyfokú proliferációs képességüknél, idegsejt-szerű receptoraiknál és fehérje expressziójuknál fogva *in vitro* modellként is használhatóak pl. az agyi betegségek funkcionális vizsgálatára [168,189,190].

2.3.2.2. A stressz hatása a fibroblasztok mRNS expressziójára

A stressz a génexpressziót erősen befolyásoló hatások közé tartozik. Fibroblaszt kultúrák esetén a glükóz eltávolítása és galaktóz adása a sejttenyésztő médiumhoz egy általánosan alkalmazott gyakorlat oxidatív stressz kiváltására. Glükózt galaktózzal helyettesített médiumban növekedés esetén a sejtek emelkedett oxigénfogyasztását mutatták ki szemben a magas (25 mM) glükóz koncentrációjú médiumban növekedett sejtekkel. Ez nagyrészt annak köszönhető, hogy a piruvát szintézise a galaktóz metabolikus útvonalán keresztül nem jár ATP termeléssel, így a galaktóz tartalmú médiumos kezelés a sejtek energia termelését az oxidatív foszforiláció felé tereli a megfelelő ATP szint fenntartása érdekében [191]. A glükózmentesítés növeli a reaktív oxigénszármazékok szintjét (ROS - reactive-oxygen species), amely egy emelkedett, kompenzáló glutationtermelésben nyilvánul meg [190]. A reaktív oxigéngyökök az emberi szervezetben különböző folyamatok során termelődnek, ide tartozik a normál sejtmetabolizmus, elsősorban a mitokondriális elektrontranszport rendszer [192]; az UV sugárzás [193] és a hősokk [194] is. A reaktív oxigéngyököktől az antioxidáns védekezés során szabadulhatunk meg, amelyet tiol-csoportot tartalmazó vegyületek végeznek, amelyek szubsztrátként játszanak szerepet az oxidációs folyamatokban. Oxidatív károsodás elsősorban akkor lép fel, mikor felborul az egyensúly a keletkező oxigéngyökök és a védelmi funkciót ellátó antioxidánsok koncentrációja között. Így az emelkedett oxigénszint az antioxidáns mechanizmusok károsodásával is magyarázható. Az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló, tiol-csoportot tartalmazó vegyület a glutation, mely fontos védekező szerepet tölt be az agyban oxidatív stressz esetén [195]. Az oxidált glutation redukált, antioxidáns formába visszajuttatásáért a glutation reduktáz enzim felel. Ezen enzim felülszabályozottságát mutatták ki oxidatív stresszválaszban [196]. Az oxidatív stressz, a glutation és a glutation reduktáz szerepe már több pszichiátriai és nem-pszichiátriai betegség esetén is felmerült, úgy mint a 2-es típusú diabetes mellitus [197], a Huntington-kór [198], a skizofrénia [199], a bipoláris betegség [200], az autizmus és az ADHD [201].

Ezzel szemben az exogén koleszterin megvonása (lipid-csökkentett médiumos kezelés) egy más típusú, de mégis hasonló metabolikus stresszt vált ki a sejtekből. A fibroblasztok a saját koleszterinük megtermelésére kényszerülnek a membránstruktúrák

felépítéséhez és fenntartásához, ezzel pedig az egész metabolikus gépezet stressz alá kerül [202]. Ez a két metabolikus stresszmodell nagy valószínűség szerint hasonló jellemzőkkel bír: növekvő glükózbeépülés a lipidekbe lipidcsökkentett médium esetén [203] és C^{14} galaktóz beépülés a galaktolipidekbe [204]. Mindezek alapján hasonló génexpressziós változásokat várhatunk el mindkét stresszor esetében.

2.3.2.2. A stressz hatása a fibroblasztok mikroRNS expressziójára

Az mRNS expresszió változások mellett munkánk során mikroRNS-ek (miRNS-ek) expressziójának változásait is detektáltuk. A miRNS-ek olyan 18-22 nukleotid hosszúságú RNS darabok, amelyek a génexpresszió folyamatában látnak el szabályozó szerepet [205]. Kulcsszerepet játszanak alapvető sejtfolyamatokban, mint pl. hogy hogyan válaszol a sejt a környezeti változásokra, azaz hogyan reagál a stresszre. A stresszválaszban történő közreműködésüket kutatások támasztják alá [206]. A miRNS-ek szerepe stressz hatása alatt többféle módon érvényesülhet: egyrészt megvalósulhat a miRNS-ek működése révén, különösen a miRNS-ek mennyiségének szabályozása révén; az mRNS célpontok száma révén vagy a miRNS-fehérje komplexek aktivitása/működése révén. Az emberi genomban több mint ezer ilyen miRNS van kódolva, melyek génjeink kb. 50%-ának szabályozásában vesznek részt. Ezen miRNS-ek expressziója szövet-, környezet- és egyénfüggő [207]. Egyetlen miRNS képes több száz mRNS expressziójának szabályozására miáltal azok degradálódhatnak, destabilizálódhatnak, tárolódhatnak vagy szállításra kerülhetnek. Ezen kívül becslések szerint az mRNS-ek mintegy 70%-a több miRNS kötőhellyel is rendelkezik [208], ami az sugallja, hogy az mRNS expresszió egy kombinatorikus miRNS szabályozás alatt áll. A miRNS-ek használatának további előnye lehetne, hogy mivel a miRNS-ek több mRNS targettel is rendelkeznek, amelyek gyakran ugyanazon jelátviteli utakhoz kapcsolódnak [209], így terápiás felhasználásuk is a jövőbeli kutatások egyik kitüntetett célja. Vizsgálataink során többek között arra is kerestük a választ, hogy milyen miRNS változások következhetnek be metabolikus stressz hatására, és hogy ezen miRNS változások befolyásolják-e, és ha igen, hogyan befolyásolják az mRNS-ek expresszióját.

Összefoglalásként tehát elmondható, hogy a fibroblaszt modellrendszer egy ígéretes lehetőség lehet arra, hogy jobban megértsük a különböző pszichogenetikai kórképeket. A minták hozzáférhetősége, a sejttenyészetek fenntartásának egyszerűsége következtében megvalósulhat az a szöveti szintű vizsgálat, amely korábban az agyszöveti minták limitáltsága miatt nem, vagy csak korlátozott mértékben volt elérhető. Tovább növeli ezen sejtek jelentőségét azon tulajdonságuk, hogy indukált pluripotens őssejt (iPSC – induced pluripotent

stem cell) állapotba programozhatóak vissza [210,211], amely állapotból a neuronális őssejtállapotba jutva gyakorlatilag korlátlan mennyiségű élő neuron állítható elő. Ezen neuronok olyan genetikai információval rendelkeznek, mely egy-egy specifikus pszichiátriai betegség kialakulását eredményezték. Az iPSC módszert már autizmus [212] és Rett-szindróma [213] esetén is biztató eredményekkel alkalmazták és lehetőség szerint egyéb pszichiátriai betegségekre is alkalmazhatóvá válhat, köztük említve a különböző szerfüggőségeket is.

3 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 *Taq*IA 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 szerettük volna kideríteni, hogy mely genetikai variánsok játszhatnak szerepet a kezelések hatékonyságában. Az ilyen jellegű vizsgálatok személyre szabott terápia kialakításában játszhatnak szerepet a jövőben, ezért a következő kérdésre fókuszáltunk:

4) Az általunk vizsgált dopaminerg gének polimorfizmusai szerepet játszhatnak-e a kezelési hatékonyság tekintetében?

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 koncentrálva:

1) Kétféle metabolikus stressz kezelést (glükóz, illetve koleszterin megvonás) alkalmazva mennyiben hasonlóak 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?

4 MÓDSZEREK

4.1. A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ SZEMÉLYEK

4.1.1. Betegek

A heroinfüggőség genetikai hátterének kutatásában a kezdeti betegcsoport 307 heroinfüggő beteget foglalt magában. Négy esetben az alanyok egyéb pszichiátriai betegségekben szenvedtek (major depresszió, skizofrénia), amely betegségek az irodalmi adatok alapján kapcsolatba hozhatóak az általunk vizsgált neurotranszmitter rendszerekkel, emiatt ezen betegek a vizsgálatból kizárásra kerültek.

Az alanyok mind magyar nemzetiségűek és az egyes esetek közt rokoni kapcsolat nem állt fent. Az elemzésre került mintába végül 303 heroinfüggő beteg került be: 211 (69,6%) férfi és 92 (30,4%) nő. A betegek 3 különböző központból kerültek felvételre: az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézetből (Budapest), a Dr. Farkasinszky Terézia Ifjúsági Drogcentrumból (Szeged) és a Nyírő Gyula Kórház Drogambulanciájáról (Budapest).

A diagnózis felállítása a DSM-IV alapján történt a kollaboráló pszichiáter munkatársaink által. A diagnózis felvételekor a betegek életkora 15-70 év között mozgott (átlagéletkor = 28,64 ± 6,45) átlagosan 7 éves heroinhasználati múlttal (2-22 év). Minden heroinfüggő beteg a heroint jelölte meg elsődlegesen használt drogként. A nem-ópiát szerhasználat (mint alkohol, kokain, marihuána, amfetamin, LSD, benzodiazepin, stb.) nem szerepelt kizáró tényezőként a vizsgálatba vételnél, hiszen a heroinfüggő betegek körében igen gyakori mind az alkohol-, a marihuána- és a kokainhasználat, mint másodlagos szer.

A metadon terápia (methadone-maintenance therapy – MMT) hatékonyságának vizsgálatába 173 metadonkezelt heroinfüggő beteg került bevonásra. Mindannyian részletes fenotípussal rendelkeztek általános demográfiai adatokat (szociodemográfiai adatok, családi jellemzők), illetve drog-karriert, kezeléssel kapcsolatos adatokat és kérdőíveket is beleértve:

1) State-Trait Anxiety Inventory (STAI) (Spielberger, 1972)
2) CES-D (Center for Epidemiologic Studies Depression Scale) (Radloff, 1977)
3) Satisfaction With Life Scale (SWLS - Diener et al, 1985; LSS - Campbell et al, 1976)
4) California Personality Inventory (Gough, 1957; Oláh, 1984)
5) Psychological Immune System Inventory (PISI) (Oláh, 2000)
6) Rokeach Value Survey (Rokeach, 1973; Szakács, 1974; Szakács and Szakács, 1988)

A kezeléssel kapcsolatos információkat a Methadone Treatment Interview-val (Demetrovics, 2001) gyűjtötték be a kollaboráló pszichológus munkatársak.

4.1.2. Kontroll személyek

Vizsgálatunkban 555 egészséges, nemre korrigált magyar kontroll személy vett részt. 386 (69,5%) férfi és 169 (30,5%) nő genotípus adatait használtuk fel egy nagy, normatív minta megalkotásához a genotípus- és allélgyakoriságok meghatározása érdekében. Ezek a személyek pszichiátriai betegségektől mentes személyek voltak. A dohányzás nem volt kizáró oka a kontroll csoportba kerülésnek.

A kutatási tervet mind az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT-TUKEB – Tudományos és Kutatásetikai Bizottság), mind a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága, mind pedig az MTA Pszichológiai Intézet jóváhagyta. Minden, a vizsgálatban résztvevő személy betöltötte 18. életévét a kutatásba való bevonás időpontjában. Minden résztvevő írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

A külföldi tanulmányutam során beállított kísérletes fibroblaszt modellrendszer esetében a kutatást jóváhagyta a Vanderbilt University testülete (University Institutional Review Board - IRB). Minden, a vizsgálatban részt vevő személy írásbeli hozzájárulását adta a részvételhez.

A kutatásban felhasznált fibroblaszt minták bőrbiopsziás mintavétel után kerültek sejtkultúrákba. 17 egészséges személy (4 férfi, 13 nő) kriobankos fibroblaszt mintáit használtuk fel különböző beállításokban. A demográfiai adatok a 3. táblázatban láthatóak. Kizáró tényezőként szerepelt mindennemű DSM-IV diagnózis vagy egyéb betegség, amely kizárja a biopszia lehetőségét.

3. táblázat - A fibroblaszt minták demográfiai adatai és pool-ozása a miRNome qPCR array-ekhez.

Csoport	ID	Kor	Átlagéletkor	Nem	Rassz	BMI
1	1	34	37,50	F	AA	23,1
	2	38		F	W	20,5
	3	48		F	W	n/a
	4	30		F	W	n/a
2	5	35	32,25	N	W	27,1
	6	40		N	W	21,2
	7	27		N	W	21,8
	8	27		N	AA	34,7
3	9	51	49,00	N	AA	26,0
	10	49		N	W	26,2
	11	52		N	W	26,3
	12	44		N	W	25,1
4	13	20	21,80	N	W	24,0
	14	22		N	W	26,8
	15	22		N	W	22,0
	16	25		N	AA	30,5
	17	20		N	W	24,0
F - férfi, N – nő, AA - afroamerikai, W - fehér, BMI - body mass index						

4.2. MINTAVÉTEL

4.2.1. DNS mintavétel a drogfüggőség vizsgálatához

A heroinfüggőség rizikófaktorainak és farmakogenetikájának vizsgálata során használt nem-invazív DNS mintavételi eljárásunk lényege a szájnyálkahártya felszínéről megfelelő mennyiségű epitheliális sejt gyűjtése, melyet fültörlő pálcika segítségével maguk a vizsgálati személyek végeztek a kollaboráló munkatársak vezetésével. A pálcika vattás végével 20 másodpercig kellett a száj egyik belső oldalát dörzsölni, majd a műveletet megismételni a másik oldallal is. A pálcikákat, felületükön a szájnyálkahártya sejtekkel vattás véggel lefelé mintavételi csövekbe helyezték („A”, illetve „B” jelzéssel és azonosító számmal ellátva), mely 400 µl lízis oldatot tartalmazott (0,1 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl pH 8,0; 0,2 mg/ml proteináz-K enzim; 0,5% nátrium lauril szulfát (SDS)). A mintavételt minden személlyel még egyszer megismételték, így összesen mindenkitől 2 mintavételi csőben, összesen 4 vattapálcika levétele történt meg. A mintákat ezután a laborunkba szállítást követően -20 °C-on tároltuk a feldolgozásig.

Az ezt követő laboratóriumi munkák, azaz a sejtek lízise és a DNS extrakció a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében folytak.

4.2.2. Bőrbiopsziás mintavétel a fibroblaszt kultúrák előállításához

A fibroblaszt modellrendszer beállításához felhasznált sejtkultúrákhoz bőrbiopsziás módszerrel gyűjtötték a mintákat. A felkar külső részéből történt a mintavétel egy 1 x 2 mm-es területen egy korábban leközölt protokoll alapján [184,214]. A minták ezután általános médiumba kerültek (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, MediaTech, Manassas, VA, USA) szérumtartalom nélkül és még aznap feldolgozásra kerültek a már korábban is hivatkozott protokolloknak megfelelően [184,214]. Médiumcsere heti 3 alkalommal történt. A sejtek a konfluenciát 2-3 héten belül érték el a növekedés sebességétől és a sejtek kiindulási számától függően. 0,5% Trypsin-EDTA-t (Invitrogen) használtam a sejtek kultúrában tartására és a szubkultúrák készítésére egy korábbi protokoll alapján [215]. A vizsgálatban felhasznált mintákat kriofagyasztóból válogattuk össze (folyékony nitrogén), majd ezt követően 25 mM glükózt és 1 mM piroszőlősav nátrium sót tartalmazó DMEM médiumban, 37°C-on és 5% CO_2 koncentráció mellett történt a kultúrák fenntartása. A médiumhoz ezen felül 2 mM L-glutamint (MediaTech), 10% FBS-t (fetal bovine serum, Fisher Scientific HyClone, Logan, UT, USA) és Penicillin/Streptomycin oldatot (MediaTech) adtunk hozzá. A kultúrák 100 mm-es sejttenyésztő edényekben (Sarstedt, Newton, NC, USA) növekedtek, kivéve, ha a kriogén fagyasztásból származó sejtek száma kevesebb volt, mint 10^6. Ebben az esetben 60 mm-es edényekbe helyeztük a sejteket, hogy megkönnyítsük azok növekedését. A növekedést és osztódást rendszeresen ellenőriztük a kísérlet teljes időtartama alatt. A konfluencia elérését és a sejtek tripszinezését követően megszámoltam a sejteket Bright-Line Hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) segítségével. Egy sejtvonalat a megfelelő sejtszám elérésekor 3 különálló plate-be különítettünk a kísérlethez (sűrűség $1{,}2x10^6$ sejt/plate), amely plateken egy éjszakán át tartó sejttapadást követően 3 különböző médiumbeállítást alkalmaztunk. Minden kultúra 7 napig növekedett másnaponkénti médiumcserével 3 különböző médiumban: 1) lipid-csökkentett médium (lipid reduced – RL; DMEM supplemented with lipid reduced FBS (Thermo Scientific HyClone, Logan, UT, USA)); galaktóz-tartalmú médium (GAL; DMEM deprived of glucose (Mediatech) supplemented with 10mM galactose); 3) standard, glükóz-tartalmú médium (STD). A sejtnövekedést és osztódást nem befolyásolta a galaktóz, illetve a lipid-csökkentett kezelés. Egy hét és három médiumcsere után a sejteket 1x HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution) (MediaTech) mostam, tripszineztem, majd 700g-n 8 percig centrifugáltam, végül jéghideg HBSS-sel újra átmostam. A lehető legtöbb folyadékot igyekeztem a pelletről eltávolítani,

ezután pedig a csöveket, a pellettel együtt szárazjégen gyorsfagyasztottam, majd -80 °C-on tároltam a felhasználásig.

4.3. DNS, RNS IZOLÁLÁS

A függőség vizsgálatában felhasznált minták izolálása a tényleges izolálási munkát megelőző éjszaka 56 °C-on egy 12 órás, proteináz-K-t és sejtpermeabilitást növelő SDS-t tartalmazó sejtlízis pufferben történő inkubálással kezdődött. A szájnyálkahártya mintákat tartalmazó fültörlő pálcikák ebben az oldatban álltak egy éjszakán át.

Másnap, az éjszakai inkubációt követően a fültörlő pálcikákat tartalmazó mintavevő csöveket 5 percig centrifugáltuk (3000 rpm), majd a pálcikákat a mintavevő cső felső részén rögzítettük. Újabb centrifugálással (3000 rpm, 10 perc) elértük, hogy a minta a cső aljában gyűljön össze, a pálcikákat ezután eltávolítottuk és a nyers kivonatból 400 μl-t Eppendorf csövekbe mértünk át. A DNS extrakcióhoz TE oldattal (10 mM Tris, pH=8,0; 1mM EDTA) telített fenolt, 24:1 arányú TE-vel telített kloroform-izoamil-alkoholt és TE-vel telített kloroformot használtunk. Először 200 μl fenolt adtunk a mintához, majd egy 30 másodperces vortexelés után 5 percig szobahőn inkubáltuk. A következő lépésben minden mintához hozzáadtunk 200 μl kloroform-izoamil-alkoholt, melyet újabb 30 másodperces keverés és szobahőn inkubálás követett. A fenolos és vizes fázis szétválasztására nagy fordulatszámú (10000 rpm) centrifugálást alkalmaztunk 1 percen át. A felülúszó vizes fázist óvatosan egy másik Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd azonos térfogatban kloroform izoamil-alkoholt adtunk hozzá. Alapos keverés után egy újabb centrifugálással ismét elválaszottuk egymástól a különböző fázisokat. Az új csőbe átmért vizes fázishoz (felülúszó) kloroformot adtunk, majd ismét keverés és centrifugálás utáni szétválasztás következett. A folyamat végén vizes fázisból 200 μl-t pipettáztunk az 1 μl 1 mg/ml dextránt tartalmazó előkészített Eppendorf csövekbe, ezután még 10 μl ammónium-acetát és 630 μl 96%-os etilalkohol hozzáadása következett. Ezt az alkoholos elegyet ezután egy éjszakán át –20 °C-on tároltuk.

Az izolálás harmadik napján összegyűjtöttük a 20 perces nagy fordulatszámú (10000 rpm) centrifugálással kinyert nukleinsav frakciót, melyet először 500 μl, majd 200 μl 75%-os hideg alkohollal tiszítottunk. A felülúszó leszívása után Speed Vac vákuum centrifuga (Savant Instruments, Farmingdale, NY) segítségével eltávolítottuk a feleslegben maradt alkoholt. A beszárított DNS-t kezdetben 20, a későbbiekben 50 μl TE-ben eluáltuk.

A fibroblaszt minták előkészítése a microarray vizsgálatra az RNS-ek kivonásával kezdődött. A fagyasztott sejtpelletekből *mir*Vana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, USA) segítségével teljes RNS és mikroRNS (miRNS) izolálást végeztem a gyártó protokollja alapján.

4.4. MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE AZ mRNS ÉS miRNS EXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOKHOZ

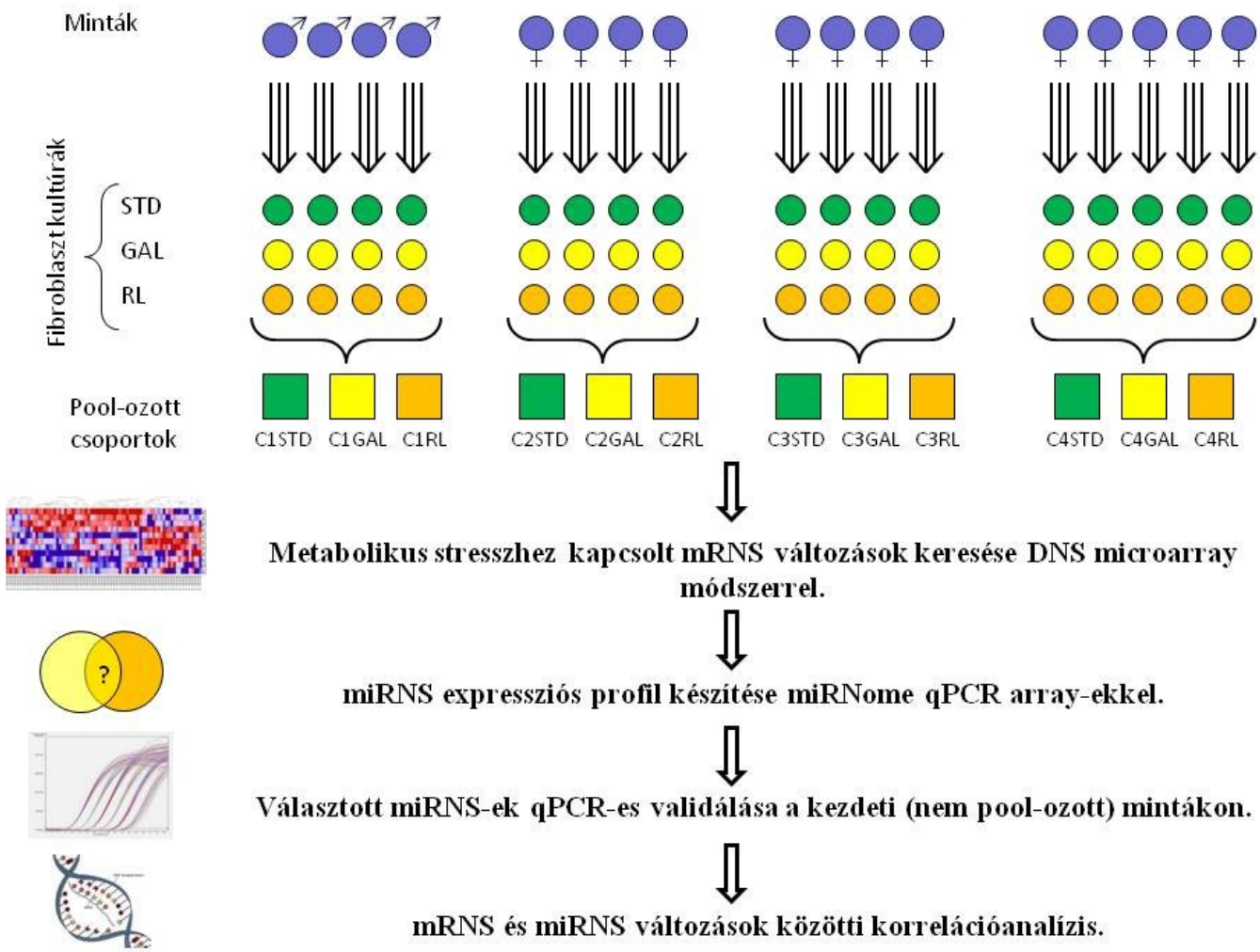
A teljes RNS-ek minőségének ellenőrzésére az Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, California, USA) rendszerét használtam a RIN (RNS minőségére vonatkozó integritási szám, jó minőségű RNS esetén RIN > 8.0) értékek meghatározására. A cDNS szintézis, amplifikáció és jelölés az Enzo Life Sciences' 100-Reaction Single-Round RNA Amplification and Biotin Labeling System (Enzo Life Sciences, Famingdale, NY, USA) kittel történt az ajánlott Affymetrix® protokoll alapján. A cDNS készítés random priming módszerrel standard T7-oligo (dT) primer felhasználásával történt 2 µg RNS-ből. T7 polimerázt használtam az amplifikált antisense RNS (aRNS) előállításához. 5 µg biotinnal jelölt, fragmentált aRNS került hibridizálásra a GeneChip HT HG-U133+ PM Array Plate (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA) chipre, amely folyamatot – beleértve a hibridizációt, a tisztítási lépéseket, a festést, a képgenerálást, szegmentációt és a minőségi analízist – a Vanderbilt microarray központ munkatársai végezték a gyártó előírásait követve. A miRNS-ekkel végzett munkát a Mirnics Labor munkatársai végezték. A miRNS-ek esetében a cDNS a miScript II RT Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) felhasználásával miScript HiSpec Buffer-rel készült. A miRNS-ek mennyiségi ellenőrzése a NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel történt és 693-839 ng/µl közötti értékeket eredményezett. A reverz transzkripció után az egyes mintákat 4 csoportba csoportosítottuk a nemet, a kort és metabolikus stresszkezelés típusát figyelembe véve. Így 4 csoportot alakítottunk ki 4-5 résztvevő mintáinak poolozásával: egy férfiakból álló és három, különböző korcsoportú nőből álló csoportot (3. táblázat). 1008 miRNS relatív mennyiségét mértük le miRNome miRNA PCR Array-eken miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) felhasználásával a gyártó protokolljának útmutatása szerint.

4.5. A MICROARRAY ADATOK ELEMZÉSE

A kísérlet áttekintése a 2. ábrán tekinthető meg.

4.5.1. A megváltozott expressziót mutató gének azonosítása

A szegmentált képek feldolgozása során a képek normalizálása és $\log_2$ transzformációja a microarray labor protokolljának megfelelően GC-robust multi-array analysis (GC-RMA) segítségével történt. Minden ezt követő elemzés ezen normalizált expressziós értékekkel történt. Az adatokat Microsoft Excel-ben (Microsoft, Redmond, WA, USA) elemeztem. Minden génpróbára kiszámoltam az átlagos értékeket. Az átlagértékeket használva elvégeztem a változások nagyságrendi értékelését egy átlagos logaritmikus hányados kiszámolásával (average logarithmic ratio – ALR; ALR=$\text{átlag}_{\text{egyik csoport}}$ - $\text{átlag}_{\text{másik csoport}}$). Ezután egy párosított, kétoldali Student-féle t-tesztet használtam az egyes csoportok közti szignifikáns különbségek felderítésére. Egy génvariánst akkor tekintettem eltérő expressziójúnak a kísérleti és kontroll csoport között, ha az $|ALR| > 0{,}378$ (1,3-szeres változás a 2 csoport között (30%); $\log_2(1{,}3)$) és ha a p-érték $< 0{,}01$. Ezekkel a feltételekkel igyekeztünk csökkenteni a lehetséges elsőfajú (type I) hibákat (kis expresszió változás, szignifikáns p-érték). A miRNS expresszió elemzésre a laborban a Ct módszert használtuk a SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A és RNU6-2 géneket housekeeping génekként használva. Egy miRNS-t akkor tekintettünk változó expressziójúnak ha $|\Delta\Delta Ct| \geq 0{,}583$ és mind a pairwise, mind a groupwise p-érték $\leq 0{,}05$ a kísérleti és kontroll csoport összehasonlításában.



2. ábra - A fibroblaszt mintákon végzett microarray vizsgálatok áttekintő folyamata.

A következőkben a heroinfüggőség vizsgálata során alkalmazott genotipizálási és kiértékelési módszereket szeretném ismertetni.

4.6. GENOTIPIZÁLÁS

Az összegyűjtött és megfelelően tárolt szájnyálkahártya mintákból DNS izolálással nyertük ki a genomi DNS-t, melyből nagyságrendileg 1 ng DNS került felhasználásra a vizsgálatba vont polimorfizmusok esetén. A módszerek laborunk és más kutatócsoportok korábbi közleményeiben részletesen is bemutatásra kerültek (DRD4 gén: -521 C/T SNP [216], 120 bp duplikáció [217], DRD4 VNTR [218]).

4.6.1. Hosszúság polimorfizmusok vizsgálata

Ezen variánsok vizsgálata esetén az egyes személyek genotípusa könnyen meghatározható, mivel ezeknek a polimorfizmusoknak a lényege, hogy az egyes emberekben az adott változat egy adott ismétlődésszámban fordul elő, így a PCR során felsokszorozott termék mérete az ismétlődések számának megfelelően különböző lesz. A különböző hosszúságú PCR termékek pedig gélelektroforézissel, illetve a futtatás során alkalmazott molekulatömeg markerekkel, vagy létrákkal egyszerűen elválaszthatóak.

Ezt a módszert alkalmaztuk az SLC6A3 (DAT) gén intron 8 VNTR és 3’ UTR régióban elhelyezkedő 40 bp VNTR polimorfizmusának, a DRD4 gén 48 bp VNTR és 120 bp duplikáció polimorfizmusainak genotípusos meghatározására. Az egyes polimorfizmusok esetében használt primerek szekvenciái és olvadáspontjaik (Tm) a 4. táblázatban láthatóak.

4. táblázat - Hosszúság polimorfizmusok genotipizálása során felhasznált primerek tulajdonságai.

Polimorfizmus	Név	Szekvencia (5' → 3')	Tm (°C)
SLC6A3 intron 8 SLC6A3 40 bp	dat1	TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AG	61,8
	dat2	CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG	63,8
DRD4 120 bp dup	120dup1c	GTT GGC TGT CTT TTC TCA TTG TTT CCA TTG	63,6
	120dup2c	GAA GGA GCA GGC ACC GTG AGC	60,7
DRD4 48 bp	48bp1	GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG	49,9
	48bp2	AGG ACC CTC ATG GCC TTG	51,9

4.6.2. Egypontos nukleotid variációk vizsgálata

Az egy bázisnyi különbségek felderítésére RFLP (restriction fragment length polymorphism – restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus) és ASA (allele-specific amplification – allél-specifikus amplifikáció) módszereket használtunk. A genotipizálási folyamatok a DRD2/ANKK1 *Taq*IA (rs1800497), a DRD2 *Taq*IB (rs1079597) és *Taq*ID (rs1800498), valamint a DRD4 -616 C/G (rs747302), -615 A/G (rs936462), -521 C/T (rs1800955) és a COMT Val158Met (rs4680) polimorfizmusainak esetében korábban az irodalomban közölt protokolloknak megfelelően zajlott [218-224]. Az SNP-k genotipizálásához felhasznált primereket az 5. táblázatban foglaltam össze. A genotipizálásokat egyes esetekben mindkét módszerrel elvégeztük egyrészt az új módszer beállítása, másrészt az eredmények megbízhatóságának ellenőrzése céljából.

4.6.2.1. Restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus vizsgálata

RFLP kimutatása során alap módszernek számít a restrikciós endonukleázok használata. Ezen enzimek a szekvencia specifikus rövid részleteit ismerik fel és ezen szekvencián belül vagy ettől jól meghatározott helyen hasítják a kettős láncot. A módszer első lépéseként PCR reakciót végzünk a megfelelő szekvenciák felszaporítása érdekében, majd a terméket a kiválasztott restrikciós enzimmel hasítjuk. Végül az emésztett fragmentumokat gél elektroforézissel tesszük láthatóvá. A módszer lényege, hogy amennyiben a restrikciós felismerőhelyben egy SNP található, az eltüntetheti vagy (a módszer megtervezésétől függően) létrehozhatja az adott enzim hasítóhelyét, így az SNP variánstól függően létrejöhet vagy sem a restrikciós hasítás, ennek megfelelően pedig a különböző hosszúságú hasítási termékek. Az ANKK1 *Taq*IA, a DRD2 *Taq*IB és *Taq*ID, a DRD4 -521 C/T és -616 C/G, illetve a COMT Val158Met polimorfizmusának esetében ezt a módszert alkalmaztuk. A felhasznált restrikciós enzimeket a 6. táblázatban foglaltam össze, feltüntetve az adott enzim felismerőhelyét.

5. táblázat - Az SNP-genotipizáláshoz felhasznált primerek és tulajdonságaik.

Polimorfizmus	Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	Tm (°C)
ANKK1 *Taq*IA RFLP			
	TaqA_1s	CCG TCG ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA	64,3
	TaqA_1as	CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA	62,2
DRD2 *Taq*IB RFLP			
	TaqB_1s	GAT ACC CAC TTC AGG AAG TC	51,8
	TaqB_1as	GAT GTG TAG GAA TTA GCC AGG	52,4
DRD2 *Taq*ID RFLP			
	TaqD_s	CCC AGC AGG GAG AGG GAG TA	57,6
	TaqD_as	GAC AAG TAC TTG GTA AGC ATG	50,5
COMT Val158Met RFLP			
	comt3	CTC ATC ACC ATC GAG ATC AA	61,6
	comt2	CCT TTT TCC AGG TCT GAC AA	60,7
COMT Val158Met ASA			
	comtagk1b	TGC TCA CCT CTC CTC CGT	49,9
	comtagk2b	ACA CCC ATA CAA GCA TTC ATC	48,9
	comta1e	TGG TGG ATT TCG CTG GCA	55,5
	comtg2d	CAC ACC TTG TCC TTC AC	39,1
-521 C/T valamint a -616 C/G RFLP primerek illetve -521 C/T ASA külső primerek			
	521ctk1	GGA ATG GAG GAG GGA GCG GG	61,4
	521ctk2	CGC TCC ACC GTG AGC CCA GTA T	62
-521 C/T ASA allél-specifikus primerek			
	521c1	GGA GCG GGC GTG GAG GGC	62,3
	521t2	GCC TCG ACC TCG TGC GCA	64,4
-616 C/G ASA primerek			
	616cgk1a	GAA CCT ACC CCG GCC TGT CGT	60,9
	616cgk2a	AGA CGG GAA TGA AGC GAG GTG G	61,1
	616c1	TGG TCG CGG GGG CTG AGC	63,8
	616g2ag	CCC CCC MGC AGC CTC TGG YC	62,5

6. táblázat - A restrikciós fragmentumhossz polimorfizmusok vizsgálatához felhasznált restrikciós enzimek és felismerő helyeik.

Polimorfizmus	Felismerő hely	Restrikciós enzim
-616GC	GAG**G**ACCAG GAG**G**GCCAG	*Sau* 96 (GGNCC)
-521CT	GG**T**GCGCACG	*Fsp* I (TGCGCA)
COMT G1947A	GGC**A**TGAA	*Nla* III (CATG)
TaqIA	GCCT**C**GACCA	*Taq* I (TCGA)
TaqIB	TATTC**A**AAAG	
TaqID	GGTT**C**GACTA	

4.6.2.2. Allél-specifikus amplifikáció

Szintén pontmutációk azonosítására alkalmazhatjuk az ASA módszert. Ebben az esetben a különböző allélekre specifikus primereket használunk, melyeket úgy tervezünk meg, hogy a 3' végen csak az adott alléllal legyenek komplemeterek. Az allél-specifikus primerek mellett két külső primert is alkalmazunk, melyek segítségével a PCR reakciót követő elektroforézis során a genotípus meghatározható. Az ASA során felhasznált primereket a 7. táblázatban tüntettem fel. A COMT gén esetén is ezt a tetra-primer PCR módszert alkalmaztunk.

A DRD4 -521 C/T SNP polimorfizmus genotípusait szintén ASA módszerrel határoztuk meg. Hasonló a helyzet a -616 C/G SNP esetén (M=A+C, Y=C+T, degenerált nukleotidok). Mivel a szomszédos -615 A/G SNP szintén egy polimorf hely, ezért degenerált nukleotidot is tartalmazó primereket terveztünk a -616 C/G genotipizálására, így a -615 A/G mindkét primere esetén elindult a reakció és nem befolyásolta a -616 C/G genotipizálási munkáját.

4.6.3. A DRD4 SNP-k haplotípus vizsgálata

A DRD4 két szomszédos variánsának (-615 A/G, -616 C/G) haplotipizálása során egy PCR-RFLP alapú, a laborban rutinszerűen alkalmazott restrikciós emésztési módszert alkalmaztunk. Mivel mindkét polimorfizmus esetén kettő volt a lehetséges allélek száma, így ezek kombinációja összesen 4 lehetséges haplotípust eredményezett. Minden egyes kombinációra külön restrikciós emésztést alkalmaztunk. Az alkalmazott enzimek és felismerő helyeik a következő táblázatban láthatóak.

7. táblázat - A DRD4 haplotípus vizsgálatához felhasznált restrikciós enzimek és felismerő helyeik.

Lehetséges kombinációk	Felismerő hely	restrikciós enzim
-616 G ~ -615 A	TGA**GGA**CCA	*Ava* II (GGWCC)
-616 C ~ -615 A	T**GAGCA**CCA	*Bsi*HKA I (GWGCWC)
-616 G ~ -615 G	TGAG**GG**CCA	*Hae* III (GGCC)
-616 C ~ -615 G	TG**AGCGC**CA	*Hae* II (RGCGCY)

A -521 C/T genotípus alapján szelektálva PCR reakciót végeztünk. A homozigóta -521 genotípus esetében egy allélra (-521 C allélra az 521c2; T allélra az 521t2 primer) specifikus antisense primert és egy -616-os pozíciótól 5' irányban tapadó sense primert (521ctk1) (8. táblázat) tartalmazó reakcióelegyet alkalmaztunk. Heterozigóta -521 genotípus esetén mindkét -521 allélra külön-külön allélspecifikus reakcióelegyet készítettünk (külön reakcióban ment a C-reakció az 521c2 primerrel és külön a T-reakció az 521t2 primerrel). A PCR termékeket mind a négy endonukleázzal emésztettük, s mivel ezen enzimek csak bizonyos haplotípus kombinációk esetén hasítanak, így a -615 ~ -616 haplotípus kombinációk elektroforetikus elválasztás után egyértelműen leolvashatóak.

8. táblázat - A DRD4 haplotípus elemzés során a -521C/T genotípusnak megfelelően alkalmazott primerek.

Primer név	Primer szekvencia (5' → 3')	Tm (°C)
521ctk1	GGA ATG GAG GAG GGA GCG GG	61,4
521c2	GCC TCG ACC TCG TGC GCG	60,4
521t2	GCC TCG ACC TCG TGC GCA	64,4

4.6.4. A felhasznált PCR reakcióelegy

Az általam végzett PCR reakciók során felhasznált mix összetétele: 2mM dNTP (dezoxiribonukleozid-trifoszfát szubsztrátok); 10x puffer (enzim optimális működéséhez); Q-oldat; víz; 5U/µl HotStarTaq (polimeráz); illetve az adott polimorfizmusnak megfelelő primerek (saját tervezés, az egyes polimorfizmusokra tervezett primerek a korábbiakban kerültek bemutatásra). 9µl PCR mixhez 1µl higított (2x-es vagy 5x-ös higítás a koncentrációtól függően: <20 ng/µl kezdeti koncentráció esetén a tömény DNS-t kétszeres higításban, míg >20 ng/µl DNS koncentráció esetén 5-szörös higításban alkalmaztuk) DNS-t használtunk fel. A haplotípus meghatározásánál a reakciót a 4-féle emésztésnek megfelelően nagyobb térfogatban állítottuk össze.

A PCR reakcióelegyekben a következő anyagokat használtuk fel:
1x Buffer (1,5 mM Mg^{2+}), mely növeli az enzimspecificitást; Q-oldat (Qiagen), amely a DNS olvadáspontját csökkentve növeli az amplifikáció hatékonyságát; 200 µM dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 0.1 U HotStarTaq DNS polimeráz és 5 ng genomikus DNS (10 µL végtérfogat). A termociklus beállításai: 95°C 15 perc denaturáció, 35-40 ciklus:

94°C, 1 perc denaturálás; 30 másodperc anneálás polimorfizmustól függő hőmérsékleten (65°C: -521 C/T, -616 C/G és a haplotípusaik; 60°C: 48 bp VNTR, DAT (SLC6A3) 3'UTR VNTR; 59°C: DAT (SLC6A3) intron 8; 58°C: 120 bp dup; 56°C: COMT Val158Met; 52°C: *Taq*IA, *Taq*IB, *Taq*ID) és 72°C, 1 perc extenzió, majd végül 10 perc polimerizáció 72°C-on. A restrikciós emésztés az adott endonukleáz és a gyártó által az enzimhez ajánlott buffer felhasználásával történt.

A *Hae* II és *Bsi*HKA I enzimekhez a leírásuknak megfelelően 0,1 g/l BSA-t is adtunk. Az emésztés a *Bsi*HKA I és a *Taq* I enzim esetén 65°C-on, a többi enzimnél 37°C-on zajlott 3 órán keresztül vagy egész éjszakán át.

4.6.5. Elektroforézis

4.5.4.1. Horizontális agaróz gél-elektroforézis

A gél-elektroforézis kiválóan alkalmas a PCR során felszaporított DNS molekulák méret szerinti elválasztására. A PCR reakció során keletkező termék méretétől, illetve a várható allélek méretkülönbségeitől függően három különböző gélt vagy azok keverékét alkalmaztuk: 1) a 2,5%-os agaróz gélt; 2) 2% metaphor – 1,5% agaróz keveréket; 3) 4% metaphor gélt. Az agaróz gél tökéletesen alkalmas nagyobb fragmensek elkülönítésére (100 bp – 5 kb) és könnyen kezelhető gél önthető belőle, míg a metaphor kisebb fragmensek (10-500 bp) specifikusabb elválasztására alkalmas, viszont a belőle öntött gél törékeny és emiatt nehezebben kezelhető. Így a pár száz bázispáros termékek elválasztására mi a kevert gélt alkalmaztuk, mely még könnyen kezelhető, a metaphornak köszönhetően pedig érzékenyebb elválasztást tesz lehetővé. A különböző polimorfizmusok esetén alkalmazott gélelektroforetikus beállításokat, futtatási időket a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat - A különböző polimorfizmusok esetén alkalmazott elektroforetikus beállítások.

PCR termék	Gél	Futtatás ideje
-616CG- -615AG *Hae* III	2% metaphor – 1,5% agaróz	45 perc
-616CG (*Sau*96 I) RFLP		40 perc
*Taq*IA	2,5% agaróz	45 perc
*Taq*IB		45 perc
*Taq*ID		45 perc

PCR termék	Gél	Futtatás ideje
DRD4 120 bp dup		1 óra
DRD4 48 bp VNTR		2 óra
-616CG ASA		1 óra
-616CG (*Ava* II) RFLP		1 óra
-521CT RFLP		1 óra
-521CT ASA		1 óra
-616CG- -615AG *Ava* II		45 perc
-616CG- -615AG *Hae* II		45 perc
-616CG- -615AG *Bsi*HKAI		45 perc
SLC6A3 intron VIII VNTR		2 óra
SLC6A3 3'UTR VNTR		1,5 óra
COMT Val158Met ASA		45 perc
COMT Val158Met RFLP	4% metaphor	45 perc

A futtatás 1x TAE (10 mM Tris-acetát (pH = 8,5) és 2 mM Na_2EDTA) pufferben történt 100-120 V közötti feszültséggel. A futás után a géleket egy 1 μg/ml etídium-bromidot (EtBr) tartalmazó TAE pufferban festettük 10-12 percen át. A kialakuló EtBr-DNS komplexek UV fény alatt láthatóvá tehetőek. A géleket a Bio-Rad Gel-Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milan, Italy) rendszerrel fényképeztük és az így készült digitális képeket használtuk fel az eredmények kiértékelésénél.

4.7. STATISZTIKAI ELEMZÉS

4.7.1. Konvencionális (frekventista) elemzés

Eset-kontroll analízisünkhöz domináns modellt használtunk fel a ritkább allél tesztelésére, azaz a genotípusokat csoportosítottuk a ritkább allél jelenléte vagy hiánya szerint. Az így kapott genotípus csoportok előfordulási gyakoriságát Khi-négyzet próbával hasonlítottuk össze az SPSS 17.0 Windows verzióját felhasználva (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A nominális szignifikancia értéke $p < 0,05$ volt. A többszörös összehasonlítás problémáját ellensúlyozva szigorú Bonferroni korrekciót alkalmaztunk: a szignifikancia küszöbértéke a heroinfüggőség és a dopaminerg gének asszociáció vizsgálata során $p < 0,0045$-re módosult, mivel 11 polimorfizmust teszteltünk.

Az ANKK1 és DRD2 egypontos variációk (*Taq*IA, *Taq*IB és *Taq*ID) közti kapcsoltságot a HaploView 4.2 programmal (Daly Lab, Cambridge, MA, USA) végeztük [225]. A haplotípusok elemzéséhez a likelihood- vagy valószínűség-alapú UNPHASED programot használtuk [226].

A szubsztitúciós terápia hatékonyságának vizsgálata során a kezelésre adott válasz szerint elválasztott genotípus-, illetve allélcsoportokat Khi-négyzet próbával hasonlítottuk össze $p < 0,05$ szignifikancia szintet alkalmazva, illetve többváltozós elemzéshez logisztikus regressziót is alkalmaztunk az SPSS 17.0 program segítségével.

4.7.2. BN-BMLA elemzés

Az alábbiakban egy olyan módszer elvét ismertetem, amely módszert a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékéről Antal Péter és Sárközy Péter mutatott be nekünk. Ezen módszerhez az általuk fejlesztett grafikus szoftvert használtuk fel az eredmények átláthatóbbá tétele érdekében.

A megszokott asszociáció tesztelések mellett egy hálózat-alapú asszociáció analízis is kivitelezésre került: a Bayes háló alapú bayesi többszintű relevancia elemzés (Bayesian network based Bayesian Multilevel Analysis of relevance, BN-BMLA). A módszer egyik központi elve az erős relevancia elve. Egy változó erősen releváns, amennyiben a statisztikai asszociáció releváns marad a többi változó függvényében is (pl. a hatását más variánsok nem befolyásolják) [227]. Ez a megközelítés általánosítható több változó vizsgálatára is. A változók egy csoportja megfelelő magyarázó változó lehet, amennyiben más változók nem mutatnak statisztikai asszociációt (pl. ha ezek a változók úgymond védik a célváltozót a többi változó hatásától) [228]. A változók ezen csoportját (X', ahol X a variánsok egy alcsoportja) Markov-láncnak nevezik (MBS(Y)) egy Y célváltozó függvényében. Amennyiben egy adott X_i változó/faktor egy Markov-lánc tagja azt a Markov-takaró (Markov blanket) tagjának (MBM – Markov Blanket Membership) nevezzük. A BN-BMLA megközelítés lehetővé teszi ezen tulajdonságok (MBS, MBM) posteriori valószínűségének kalkulációját azáltal, hogy lehetséges halózati struktúrákat tesztel véletlenszerű módon Markov-lánc Monte Carlo szimuláció használatával. Mi egy korábban publikált módszert használtunk fel az MBM és MBS posterior valószínűségek számolására a következő beállításokat használva: $8x10^6$

MCMC (Markov Chain Monte Carlo) lépés, 10^6 burn-in lépés, 5 maximum parents, Cooper-Herskovits prior (a folyamat részletes leírásához lásd: [229]).

A módszer lehetőséget biztosít egy változóhalmaz $\{X_{i1}, \ldots, X_{in}\}$ interakcióinak vagy redundanciáinak számszerűsítésére egy D adathalmaz esetén. Az interakció és redundancia értékeket (R) X_i, X_j prediktor párokra az alábbi képlettel számoltuk:

$$R_{i,j} = \frac{P\left(X_i, X_j \subseteq \mathrm{MBS}(Y) \middle| D\right)}{P(X_i \subseteq \mathrm{MBS}(Y)|D) * P\left(X_j \subseteq \mathrm{MBS}(Y) \middle| D\right)}$$

A módszert alkalmazva az R értékek 1-től való eltéréséből következtethetünk, hogy interakció (R>1) vagy redundancia (R<1) esete áll fenn. Az ehhez tartozó Interakciós hányados (IR – Interaction Ratio) az IR=ln(R), míg a Redundancia hányados (Redundancy Ratio) az RR=-ln(R) képlettel számolható.

A továbbiakban a metabolikus stresszkezelés hatására bekövetkező expressziós változások elemzéséhez kapcsolódó technikákat ismertetem.

4.8. HIERARCHIKUS KLASZTEREZÉS

A megváltozott expressziót mutató gének egy kétutas hierachikus klaszterezésen mentek át Euklidészi távolságot (Euclidean distance) alkalmazva a GenePattern programmal [230]. Ez a módszer lehetővé teszi a gének és minták klaszterezését, csoportosítását annak megfelelően, hogy mennyire állnak közel egymáshoz, továbbá a módszerrel lehetővé válik vizuálisan megjeleníteni, amennyiben a minták az expressziós változás alapján elkülöníthetőek. Az mRNS esetén az RMA-normalizált log2-es expressziós értékeket, míg a miRNS-ek esetében a ΔCt értékeket használtuk fel az elemzésekhez. A korrelációkat Microsoft Excelben, Pearson koefficiens használatával számoltuk.

4.9. IRODALOMKUTATÁS

Miután azonosítottuk a kísérleti és kontroll csoportok között szignifikáns génexpresszió változást mutató géneket, alapos irodalomkutatásnak vetettük alá őket különböző forrásokat használva, úgy mint: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), HuGe Navigator (http://hugenavigator.net/HuGENavigator/home.do), valamint a GeneCards (http://www.genecards.org/). Mindezek mellett egy informatív összefoglaló megírására is sort kerítettünk, melyben az egyes génekre vonatkozó legfontosabb információkat gyűjtöttük össze, hogy csoportosíthassuk őket a biológiai funkcióiknak megfelelően.

4.10. GSEA - GENE SET ENRICHMENT ANALÍZIS

Az irodalomkutatás alapján történő klasszifikáción túl egy gene set enrichment elemzést is végeztünk előre meghatározott génklasszifikáció alapján. Habár az irodalomkutatás egy erős és alapos módszer, hátrányai is vannak: a szubjektivitás befolyásolhatja a csoportkialakítást. Éppen ezért hajtottuk végre a BioCarta adatbázis adatai alapján a GSEA elemzést, amely meghatározza, hogy egy *a priori* meghatározott géncsoport statisztikailag szignifikáns különbséget mutat-e előfordulását tekintve az összehasonlítandó csoportjaink között. A gének az expresszió szint szerint vannak rangsorolva és a program 4 fő statisztikai módszert alkalmaz GSEA elemzésben: enrichment score (ES), mely annak mértékét tükrözi, hogy egy adott génkészlet mennyire felülreprezentált a mintában; *normalized enrichment score (NES)*, amely egy ES a génkészlet méretére normalizálva; *nominal p-value*, amely az ES statisztikai szignifikanciáját becsli egy génkészletre; *FDR q-value*, amely annak a valószínűségét becsli, hogy egy adott génkészlet egy adott NES értékkel fals pozitív eredményt ad. $p < 0,05$ és $q < 0,25$ értékeket használtunk a megváltozott expressziót mutató génkészletek azonosítására csoportjaink között.

4.11. AZ mRNS TALÁLATOK VALIDÁLÁSA

Az útvonalanalízis eredményeire alapozva 10 lipid bioszintézisben résztvevő gént választottunk ki qPCR-es validálás céljából és ezen ellenőrzést minden egyes személyre elvégeztük (N=17). A Qiagen RT2 First Strand Kit használatával a teljes RNS-ek reverz transzkripcióját végezték el a labor munkatársai, majd a Qiagen RT2

Profiler PCR Array-ek használatával ABI Prism 7300 rendszeren (Applied Biosystems) ellenőrizték a minták Ct értékeit a 10 választott gén (SCD, FABP3, DHCR7, INSIG1, QPRT, HMGCR, HMGCS1, LDLR, FADS1, FADS2) és a 2 houskeeping gén (ACTB, GAPDH) esetében. A Ct értékek kiértékelését a SABiosciences PCR Array Data Analysis Template Excel szoftver segítségével végezték.

4.12. A miRNS TALÁLATOK VALIDÁLÁSA

22 miRNS-t választottunk ki további nyomonkövetésre a 17 mintánkon: hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-550a, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-214, hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-132, hsa-miR-376c, hsa-miR-19a, hsa-miR-195, hsa-miR-181a, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-377, hsa-miR-424, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-22, hsa-miR-103a, hsa-miR-376b, hsa-miR-29b, hsa-miR-185, hsa-miR-564, hsa-miR-34a). Az assay-k azonosak a már korábban említettekhez, melyeket a pool-ozásnál is alkalmaztunk.

5 EREDMÉNYEK

A következőkben a heroinfüggőség és a dopaminerg rendszer asszociáció vizsgálatának eredményeit szeretném folyamatában bemutatni, ezek után térnék rá a szubsztitúciós terápia hatékonyságát befolyásoló genetikai tényezők elemzésére.

5.1. ESET-KONTROLL ELEMZÉS

303 magyar heroinfüggő beteg és 555 egészséges magyar kontroll személy mintája került végső elemzésre 7 dopaminerg SNP és 4 VNTR esetében. Az eredményeket nemre korrigáltuk, így mind a beteg, mind az egészséges populációban 70:30 volt a férfiak és nők aránya. Az általunk vizsgált polimorfizmusok legfontosabb jellemzői – beleértve a tartalmazó gén nevét, kromoszómális elhelyezkedését, genomkoordinátáit, a vizsgált polimorfizmus rs számát vagy az ismétlődő régió hosszát, a variánsok alternatív neveit, génen belüli lokalizációjukat, illetve a MAF (minor allele frequency – ritkább allél előfordulása) értékeket – a 10. és 11. táblázatokban láthatóak SNP és VNTR szerinti bontásban. Az SNP-ket tartalmazó táblázatban a feltüntetett MAF értékek - azaz a ritkább allélek előfordulási gyakoriságai - az ALFRED (The ALlele FREquency Database) adatbázis adatainak megfelelően lettek feltüntetve, kiegészítve a jelen vizsgálatunkból kapott MAF értékekkel. Egyes esetekben csak magyar allélgyakorisági értékek voltak elérhetőek az adatbázisban. A VNTR-eket tartalmazó táblázat hasonló módon foglalja össze az adott variánsok alapvető tulajdonságait, tartalmazva az ismétlődő régió bázispárban mért hosszát.

10. táblázat - A dopaminerg rendszer genetikai variánsai – SNP polimorfizmusok és tulajdonságaik.

Gén szimbólum, név**		Kromoszómális elhelyezkedés	Genomkoordináta	rs szám	Alternatív név	Génen belüli elhelyezkedés	MAF*	MAF saját adat
COMT	Catechol-O-methyltransferase	22q11.21	22:19,929,262 - 19,957,497	rs4680	Val158Met	exon 3	0,558	0,470
DRD2	Dopamine receptor D2	11q23	11:113,280,316 - 113,346,000	rs1079597	*Taq*IB	intron 1	0,163	0,140
				rs1800498	*Taq*ID	intron 2	0,360	0,400
ANKK1	Ankyrin repeat and kinase domain containing 1	11q23.2	11:113,258,512 - 113,271,139	rs1800497	*Taq*IA	exon 8	0,190	0,170
DRD4	Dopamine receptor D4	11p15.5	11:637,304 - 640,705	rs1800955	-521 C/T	5' promoter	0,400	0,470
				rs936462	-615 A/G	5' promoter	0,132‡	0,130
				rs747302	-616 C/G	5' promoter	0,485‡	0,480

* MAF forrás: ALFRED adatbázis – kevert európai populáció

**Hivatalos jelölés a HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) adatbázisa alapján

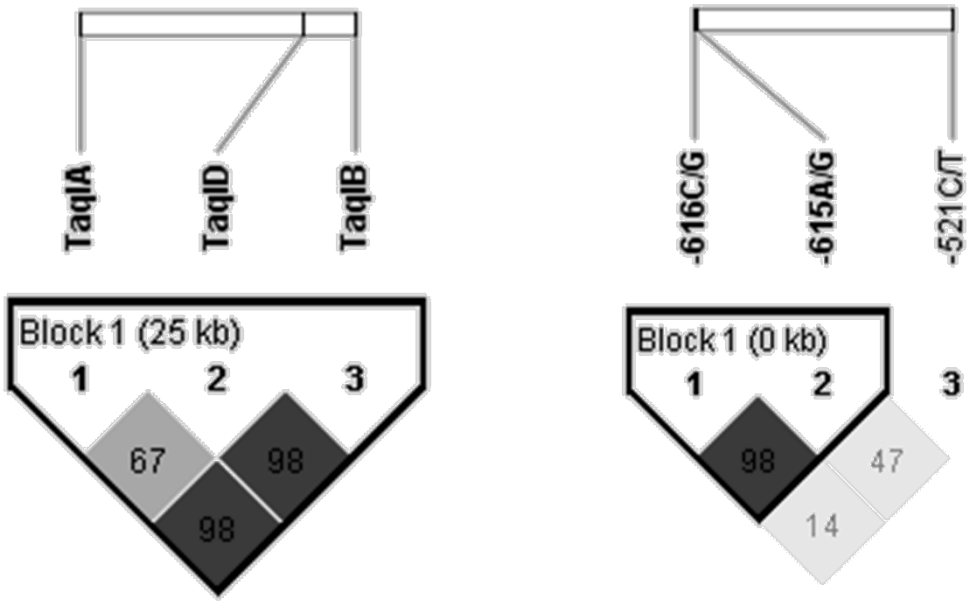
‡ Csak magyar adat volt elérhető [222]

11. táblázat - A dopaminerg rendszer genetikai variánsai – Hosszúság polimorfizmusok és tulajdonságaik.

Gén szimbólum, név*		Alternatív név	Kromoszómális elhelyezkedés	Genomkoordináta	Ismétlődő régió	Génen belüli elhelyezkedés
DRD4	Dopamine receptor D4		11p15.5	11: 637,304 - 640,705	120 bp dup	1,2 kb az iniciációs kodon előtt
					48 bp VNTR	exon 3
SLC6A3	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	Dopamine transporter 1 (DAT1)	5p15.33	5:1,392,904 - 1,445,542	40 bp VNTR	3' UTR
					intron 8 VNTR	intron 8

*Hivatalos jelölés a HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) adatbázisa alapján

Mivel egyazon génen belül helyenként több polimorfizmus is elemzésre került, ezért indokolt volt ezen polimorfizmusok génenkénti kapcsoltsági – linkage disequilibrium (LD) - vizsgálata. Linkage disequilibrium áll fenn két egyazon kromoszómán lévő markerpozíció között, ha a két pozíción található alléleket tekintve bizonyos allélkombinációk gyakorisága eltér az egyes allélek gyakoriságának szorzatától.



3. ábra - A DRD2/ANKK1 és a DRD4 SNP-k kapcsoltsági értékei.

A DRD2/ANKK1 és DRD4 gén polimorfizmusai közti linkage disequilibrium tesztelésére a HaploView 4.2 programot használtuk. Az eredmények a DRD2 esetében a 3. ábra bal, a DRD4 esetében a jobb oldalon láthatóak. Erős LD-ot találtunk a *Taq*IA és *Taq*IB esetében (98%). Habár Neville és mtsai. [105] azt mutatták ki, hogy a *Taq*IA valójában az ANKK1-es génben található, a két SNP között még így is erős maradt az asszociáció (98%). Érdekesség, hogy a harmadik vizsgált SNP (*Taq*ID) a két erősen kapcsolt gén között fekszik (lásd korábban: Taq polimorfizmusok kromoszóma elhelyezkedése ábra), mégis kétértelmű képet mutat: erősen kapcsolt a *Taq*IB SNP-hez (98%), de a *Taq*IA-hoz nem (67%). A DRD4 gén két szomszédos SNP-je a promoter régióban 615, illetve 616 bázispárral megelőzve a start kodont szintén erősen kapcsoltak

(98%) az elvárásoknak megfelelően. Másrészről a -521 C/T SNP csak gyenge kapcsoltságot mutat az előzőekkel (47%).

Eset-kontroll elemzésünk összefoglalása a 12. táblázatban látható. Mind a gyakran használt polimorfizmus nevek, mind az rs számok feltüntetésre kerültek a könnyebb megértés érdekében. A táblázat tartalmazza az esetszámokat (N) és a vonatkozó százalékokat (%) is minden kontroll, illetve beteg genotípus kategória esetében. A megfigyelt genotípus gyakoriságok a kontroll csoportban minden SNP esetében megfelelnek a Hardy-Weinberg egyensúlynak (HWE; p-értékek a HWE oszlopban), mivel a p-értékek minden esetben a $p < 0,05$ szignifikancia határ felett maradtak. Ez jelzi, hogy az adott variáns genotípus gyakoriságai nem különböztek szignifikáns mértékben a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A hosszúság polimorfizmusok esetében a genotípusok a második leggyakoribb allél jelenléte vagy hiánya szerint csoportosításra kerültek és a Hardy-Weinberg egyensúlyt ezekre a kategóriákra számolva tüntettük fel. A VNTR genotípusok teljes listája, mely tartalmazza az összes lehetséges variánst, a 13. táblázatban látható.

Eset-kontroll analízisünk frekventista módszerrel történő elemzése a ritkább allél jelenlétén vagy hiányán alapult (domináns modell). Minden p-érték, amely nominális szignifikanciát mutat ($p < 0,05$), félkövér formátumban látható a táblázatban. Az adatokból látható, hogy a ritkább allélt (T) tartalmazó genotípusok (CT + TT) az ANKK1 gén *Taq*IA polimorfizmusának (rs1800497) esetében felülreprezentáltak a betegek körében (6,1% + 34%) a kontrollokhoz viszonyítva (3,2% + 27,9%), ami a T allél heroinfüggőségben játszott lehetséges genetikai szerepére utal ($p = 0,009$). Hasonló hatásra derült fény az erősen kapcsolt DRD2 *Taq*IB SNP (rs1079597) esetén is: a ritkább A allélt tartalmazó genotípusok felülreprezentáltak a heroinfüggő betegek körében (4,6% + 31,3%) a kontrollcsoporthoz viszonyítva (2,3% + 23,5%, $p=0,003$).

12. táblázat - Az eset-kontroll elemzés eredményeinek összefoglalása.

Gén	Marker	Genotípus	Kontroll csoport		HWE	Beteg csoport		HWE	Eset-kontroll: Domináns modell	
			N	%	p-érték	N	%	p-érték	p-érték	OR (95% CI)
COMT	Val158Met rs4680	GG	125	22,5%	0,99	75	24,8%	0,993	0,329	1,17 (0,85 - 1,62)
		AG	275	49,6%		152	50,4%			
		AA	155	27,9%		75	24,8%			
ANKK1	*Taq*IA rs1800497	TT	17	3,2%	0,912	18	6,1%	0,757	**0,009**	**1,49** (1,11 - 2,00)
		CT	148	27,9%		100	34,0%			
		CC	366	68,9%		176	59,9%			
DRD2	*Taq*IB rs1079597	AA	12	2,3%	0,833	13	4,6%	0,869	**0,003***	**1,61** (1,18 - 2,21)
		AG	123	23,5%		88	31,3%			
		GG	388	74,2%		180	64,1%			
	*Taq*ID rs1800498	CC	78	15,8%	0,989	56	19,4%	0,898	0,381	1,15 (0,84 - 1,56)
		CT	239	48,2%		138	47,8%			
		TT	178	36,0%		95	32,8%			
DRD4	-521 C/T rs1800955	CC	111	21,0%	0,989	61	20,2%	0,282	**0,007**	**0,66** (0,48 - 0,89)
		CT	278	52,6%		134	44,4%			
		TT	140	26,4%		107	35,4%			
	-615 A/G rs936462	GG	4	0,8%	0,18	5	1,7%	0,731	0,302	1,18 (0,86 - 1,63)
		AG	128	24,2%		80	26,6%			
		AA	395	75,0%		215	71,7%			
	-616 C/G rs747302	GG	120	22,5%	0,927	62	20,5%	0,307	0,610	1,09 (0,79 - 1,50)
		CG	271	50,7%		164	54,3%			
		CC	143	26,8%		76	25,2%			
	120dup	1-absent	392	70,9%	0,974	211	69,6%	0,851	0,702	1,06 (0,78 - 1,44)
		1-present	161	29,1%		92	30,4%			
	48bp VNTR	7-absent	337	62,3%	0,219	195	64,8%	0,977	0,472	0,90 (0,67 - 1,20)
		7-present	204	37,7%		106	35,2%			
SLC6A3	40 bp VNTR	9-absent	275	51,2%	0,998	164	56,2%	0,928	0,092	0,78 (0,59 - 1,04)
		9-present	262	48,8%		128	43,8%			
	intron 8 VNTR	2-absent	343	63,3%	0,852	195	64,8%	0,108	0,664	0,94 (0,70 - 1,26)
		2-present	199	36,7%		106	35,2%			

HWE: A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés p-értéke; OR: Odds ratio – esélyhányados; CI: konfidencia intervallum
***: szignifikáns a Bonferroni korrekciót követően: p < 0,0045 (0,05/11) 11 tesztre**

13. táblázat - A hosszúság polimorfizmusok teljes genotípuslistája csoportosítás nélkül.

Gén	Polimorfizmus	Genotípus	Kontroll csoport		Heroinfüggő betegek	
			N	%	N	%
DRD4	120dup	11	13	2,4%	10	3,3%
		12	148	26,8%	82	27,1%
		22	391	70,7%	210	69,3%
		23	1	0,2%	1	0,3%
	48bp VNTR	22	4	0,7%	7	2,3%
		23	4	0,7%	2	0,7%
		24	69	12,8%	26	8,6%
		27	25	4,6%	8	2,7%
		28	1	0,2%	0	0,0%
		33	2	0,4%	0	0,0%
		34	23	4,3%	12	4,0%
		37	12	2,2%	4	1,3%
		44	214	39,6%	139	46,2%
		45	6	1,1%	4	1,3%
		46	3	0,6%	0	0,0%
		47	130	24,0%	83	27,6%
		48	7	1,3%	3	1,0%
		49	2	0,4%	2	0,7%
		55	1	0,2%	0	0,0%
		57	4	0,7%	0	0,0%
		67	0	0,0%	1	0,3%
		77	31	5,7%	9	3,0%
		78	2	0,4%	0	0,0%
		79	0	0,0%	1	0,3%
		410	1	0,2%	0	0,0%
SLC6A3	3' UTR 40 bp VNTR	79	1	0,2%	1	0,3%
		99	43	7,8%	20	6,6%
		610	1	0,2%	1	0,3%
		810	1	0,2%	2	0,7%
		910	219	39,7%	108	35,8%
		911	5	0,9%	0	0,0%
		915	1	0,2%	0	0,0%
		1010	275	49,8%	164	54,3%
		1011	4	0,7%	6	2,0%
		1013	1	0,2%	0	0,0%
		1014	1	0,2%	0	0,0%
	intron 8 VNTR	22	20	3,7%	19	6,3%
		23	179	33,0%	87	28,9%
		33	343	63,3%	195	64,8%

Mint az a 12. táblázatban is látszik e polimorfizmusok esélyhányadosai relatíve magasak (1,49 és 1,61 a *Taq*IA és *Taq*IB esetén). Mindezeken felül a DRD4 -521 C/T polimorfizmusa is nominális szignifikanciát mutatott a heroinfüggőséggel (p = 0,007). Habár a két allél közel egyenlő gyakorisággal fordul elő, a ritkább C allél úgy tűnik, hogy védő szerepet tölt be a heroinfüggőséggel szemben, mivel mind a CC, mind a CT genotípusok alacsonyabb gyakorisággal fordulnak elő a betegek körében (20,2% + 44,4%), mint a kontrollok esetében (21,0% + 52,6%). Az általunk vizsgált egyéb polimorfizmusok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a genotípusok eloszlásában a beteg és kontrollcsoportok között. A többszörös összehasonlítás miatt a szigorú Bonferroni korrekciót alkalmaztuk, melynek lényege, hogy ha több hipotézist tesztelünk egyidejűleg ugyanazon mintán, akkor a szignifikancia szintet a hipotézisek számával – jelen esetben az elvégzett Khi-négyzet próbák számával – kell korrigálni (p < 0,0045 (0,05/11) a 11 tesztre). A szignifikancia szint szigorításával csökkentettük az elsőfajú (type I vagy fals pozitív) hibák valószínűségét, tehát azt, hogy elvetjük a hipotézisünket, pedig igaz, ellenben növeltük a másodfajú (type II, fals negatív) hiba valószínűségét. A korrekciót követően mindössze a DRD2 *Taq*IB SNP hatása maradt szignifikáns (csillaggal jelölve a 12. táblázatban), mely azt sugallja, hogy a DRD2 *Taq*IB ritkább allélja erősen releváns tényező a heroinfüggőség kialakulásának genetikai hátterében.

5.2. TÖBB VARIÁNS EGYÜTTES HATÁSÁNAK ELEMZÉSE

Mivel a Bonferroni korrekció az egyik legszigorúbb módszer többszörös összehasonlításos adatok esetében, több variáns együttes hatását is teszteltük, hogy kivédjük a fals negatív eredmények eshetőségét, azaz, hogy elfogadjuk a hipotézisünket, habár az nem igaz. Első lépésben egy haplotípus elemzést végeztünk a DRD2/ANKK1 gének *Taq*I polimorfizmusaira, hogy teszteljük az egyes polimorfizmusok együttes hatását. Az eredmények a 14. táblázatban láthatóak. Habár nominálisan szignifikáns asszociációt találtunk a *Taq*IA-*Taq*IB, *Taq*ID-*Taq*IB és *Taq*IA-*Taq*ID-*Taq*IB (p=0,0063; p=0,0136; p=0,028) haplotípusok esetében a heroinfüggőséggel, ezen eredmények nagy valószínűséggel egyszerű következményei a ritka allélek szoros kapcsoltságának.

14. táblázat - Az ANKK1 és DRD2 SNP-k haplotípus elemzésének eredményei.

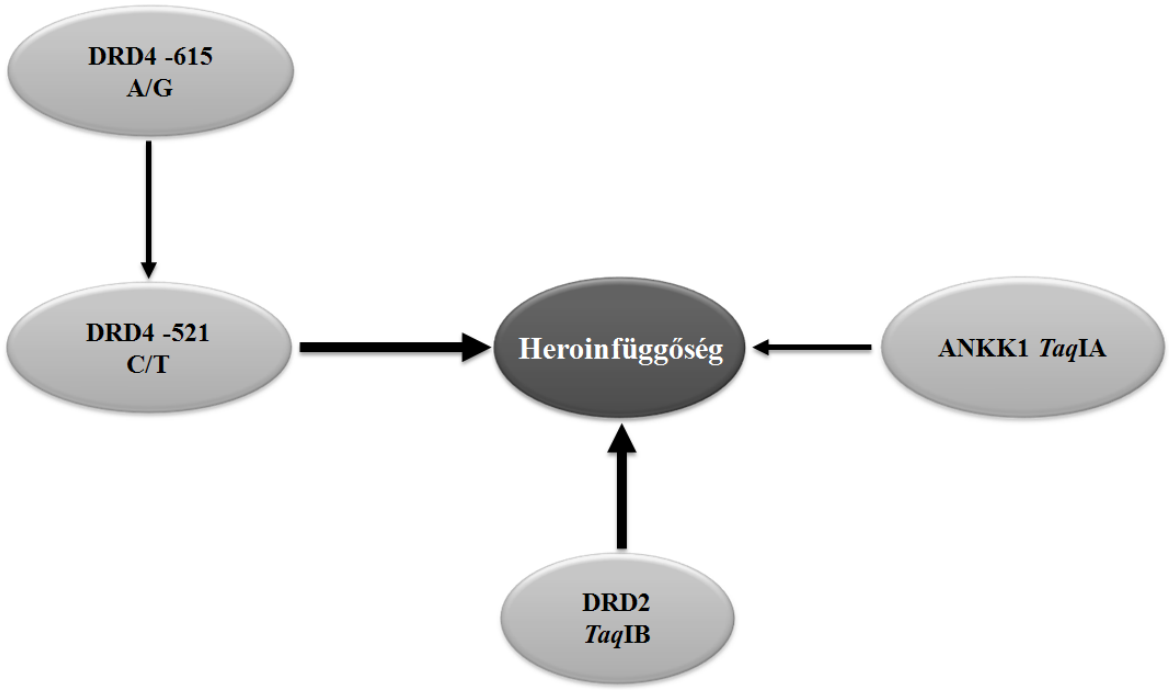
Polimorfizmusok	Haplotípusok	Kontroll csoport	Beteg csoport	Likelihood ratio	df	p-érték
TaqIA - TaqID	C ~ C	0,248	0,2382	6,59	3	0,0860
	C ~ T	0,5694	0,5248			
	T ~ C	0,1472	0,1921			
	T ~ T	0,03537	0,04486			
TaqIA - TaqIB	C ~ A	0,001	0,0037	12,35	3	0,0063
	C ~ G	0,8294	0,7579			
	T ~ A	0,1382	0,1991			
	T ~ G	0,0314	0,03929			
TaqID - TaqIB	C ~ A	0,1502	0,2011	10,68	3	0,0136
	C ~ G	0,2458	0,2311			
	T ~ A	0	0,0046			
	T ~ G	0,604	0,5622			
TaqIA - TaqID - TaqIB	C ~ C ~ A	0,0011	0,00375	14,14	6	0,0280
	C ~ C ~ G	0,2435	0,232			
	C ~ T ~ G	0,5762	0,5223			
	T ~ C ~ A	0,147	0,1974			
	T ~ C ~ G	0,0022	0			
	T ~ T ~ A	0	0,004609			
	T ~ T ~ G	0,03	0,03985			

A szorosan kapcsolt *Taq*IA és *Taq*IB SNP-k T ~ A ritka allél haplotípusa felülreprezentált a betegek körében (19,9%) a kontrollokhoz viszonyítva (13,8%), amely a T ~ A haplotípus és a heroinfüggőség asszociációjára utal ($p = 0,0063$). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a kapcsolt ritka allélek (T ~ A) és gyakori allélek (C ~ G) haplotípus gyakorisága közel 97% (13,8% és 82,9% a kontrollok esetében), a többi haplotípus rendkívül ritka. Így a T ~ A haplotípus és a heroinfüggőség közti asszociáció direkt következménye lehet az asszociáló ritka alléleknek. A DRD4 promoter SNP-inek haplotípus frekvenciáit szintén kiszámoltuk, majd összehasonlítottuk a heroinfüggő csoport és a kontroll csoport értékeit, de szignifikáns hatást nem találtunk (15. táblázat).

Független elemzésként alkalmaztuk a Bayes háló alapú bayesi többszintű relevancia elemzést annak érdekében, hogy a dopaminerg rizikófaktorok heroinfüggőségben betöltött szerepét értékelni és validálni tudjuk. Ugyanazon feno- és genotípus adatokat alkalmazva, mint a korábbi elemzéseknél összefoglaltuk a Bayesi háló eredményeit a 4. ábrán.

15. táblázat - A DRD4 SNP-k haplotípus elemzésének eredményei.

Polimorfizmusok	Haplotípusok	Kontroll csoport	Beteg csoport	Likelihood ratio	df	p-érték
521 C/T - 615 A/G	C ~ A	38,2%	31,4%	7,388	3	0,06
	C ~ G	8,9%	11,2%			
	T ~ A	48,8%	53,6%			
	T ~ G	4,1%	3,8%			
521 C/T - 616 C/G	C ~ C	21,9%	17,5%	5,54	3	0,136
	C ~ G	25,4%	24,9%			
	T ~ C	29,7%	34,9%			
	T ~ G	23,0%	22,8%			
615 A/G - 616 C/G	A ~ C	52,8%	52,1%	3,35	3	0,34
	A ~ G	34,4%	32,9%			
	G ~ C	0,0%	0,3%			
	G ~ G	12,9%	14,8%			
521 C/T - 615 A/G - 616 C/G	C ~ A ~ C	22,5%	17,5%	10,1625	6	0,118
	C ~ A ~ G	15,7%	13,9%			
	C ~ G ~ C	0,0%	0,3%			
	C ~ G ~ G	8,9%	11,0%			
	T ~ A ~ C	29,7%	34,6%			
	T ~ A ~ G	19,0%	19,0%			
	T ~ G ~ G	4,1%	3,7%			



4. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés összefoglalása.

Grafikus módon megjelenítve eredményeink az ANKK1 (*Taq*IA), a DRD2 (*Taq*IB) és a DRD4 (-521 C/T) génpolimorfizmusok szignifikáns hatását mutatták, mely eredmények összecsengenek a többszörös tesztelés nélküli single marker elemzés eredményeivel. A hálózati képen a nyilak vastagsága az adott hatás erősségére utal, melyből a *Taq*IB és a -521 C/T *Taq*IA-val szembeni kifejezettebb hatása tűnik szembe.

További érdekes eredményt hozott a BN-BMLA elemzés, miszerint egy másik DRD4 promoter polimorfizmus (-615 A/G) indirekt hatással bír a célváltozónkra, a heroinfüggőségre. Az eredmények azt mutatták, hogy a -615 A/G polimorfizmus hatása egy másik DRD4 polimorfizmus, a -521 C/T-n keresztül valósul meg, ahogy az az ábrán is látható. Ezen SNP-k kombinált hatását klasszikus statisztikai módszerrel vizsgálva is ezt az eredményt láthatjuk a 16. táblázatban.

16. táblázat - DRD4 -615 A/G és -521 C/T SNP-k kombinált hatásának elemzése klasszikus statisztikai módszerrel.

			DRD4 -521 C/T				p-érték*	OR** (95% CI)
			C-hiány (TT)		C-jelenlét (CC,CT)			
DRD4 -615 A/G	G-hiány (AA)	kontroll	114	21,9%	275	52,8%	**0,0013**	**1,77** (1,25 - 2,50)
		beteg	91	30,3%	124	41,3%		
	G-jelenlét (AG, GG)	kontroll	23	4,4%	109	20,9%	1,0000	0,93 (0,45 - 1,93)
		beteg	14	4,7%	71	23,7%		

*Pearson Khi-négyzet Exact Sig. (2-oldali)

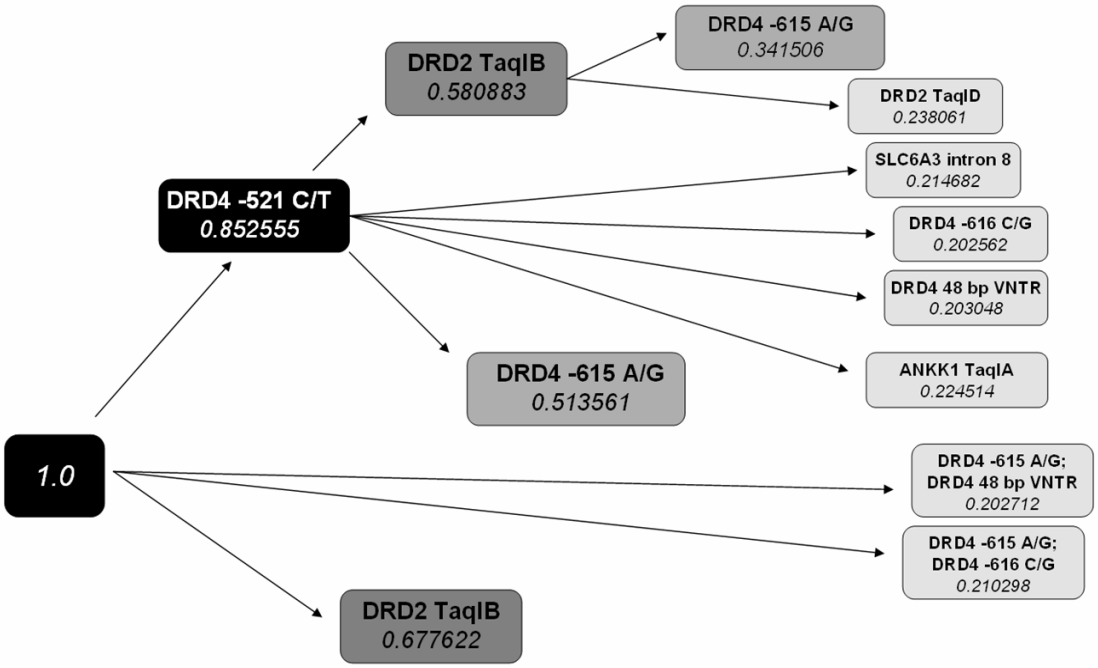
**OR: Odds ratio - esélyhányados, CI: konfidencia intervallum

A -615 G allél jelenlétében semmiféle különbség nem volt megfigyelhető a DRD4 -521 C/T genotípus eloszlásában, ám ezen allél hiányában a -521 C/T polimorfizmusnak szignifikáns hatása volt kimutatható ($p = 0,0013$). Ezen eredmények jól összecsengenek a fentebb kimutatott (4. ábra) DRD4 -615 A/G SNP indirekt hatásával.

Egy másik érdekes eredménye a BN-BMLA elemzésnek a *Taq*IB polimorfizmus kifejezettebb hatása a *Taq*IA-val szemben. A hálózat-analízis eredményeinek megfelelően erős redundáns hatás volt kimutatható a DRD2 és ANKK1

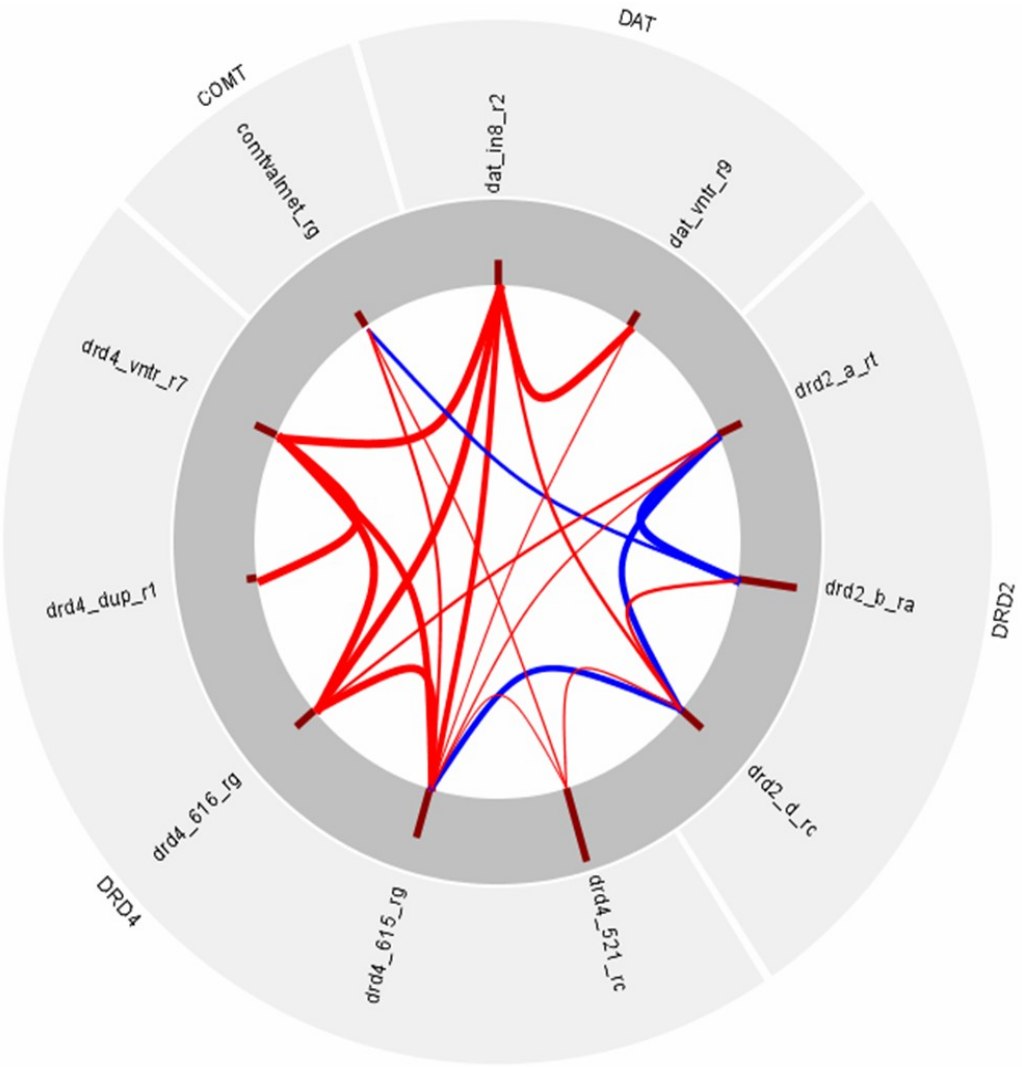
génpolimorfizmusok között (1,201-es redundancia hányados). Ez azt jelenti, hogy a posterior valószínűsége, hogy a *Taq*IB vagy *Taq*IA önmagában szerepel a modellünkben nagyobb, mint annak a valószínűsége, hogy együtt szerepelnek a modellben. Az alkalmazott modell magasabb posterior valószínűséget mutat a DRD2 *Taq*IB (p=0,68) relevanciájára, mint az ANKK1 *Taq*IA esetében (p=0,22), így a *Taq*IA hatása elhanyagolhatónak tűnik a *Taq*IB-hez viszonyítva.

Az egyes variánsok együttes, releváns előfordulására a BN-BMLA módszerrel egy szintén grafikusan megjeleníthető, multivariáns modelleket magában foglaló számolás végezhető. Ezen modelleket az 5. ábrán lehet látni, bal oldalról kezdve az üres modellel.



5. ábra - BN-BMLA többszintű relevancia elemzés modellje a relevancia értékekkel.

Minden egyes lépés a dendrogrammon a gyökértől kezdve egy újabb variánst ad hozzá a modellhez. A p-érték az egyes csomópontokban található génnevek alatt az adott modell posterior valószínűségét jelenti. Az általunk használt Bayesi háló (4. ábra) 3 lépésből érhető el a dendrogrammon. A BN-BMLA analízis részletes eredményei a 6. ábrán láthatóak az egyes polimorfizmusok közti relevanciák, redundanciák és interakciók figyelembevételével.



6. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés eredményeinek összefoglaló kördiagramja az interakciók és redundanciák feltüntetésével.

BN-BMLA módszer eredményei a belső sötétszürke gyűrűben láthatóak. A piros oszlopok magassága az adott variáns Markov-takaróban való jelenlétének valószínűségére utal (a Markov-takaró olyan változók halmaza, amelyek ismeretében a célváltozó független az összes többi változótól). A variánsok a külső gyűrűben csoportosítva is megtalálhatóak a génjeik alapján. A középen látható összekötő vonalak az egyes variánspárok interakciós és redundancia értékeire vonatkoznak, ahol a vonalak vastagsága a hatás erősségére utal, a piros szín az interakciót, a kék pedig a redundanciát hivatott jelezni. A génpolimorfizmusok neve után található r betűvel kezdődő tag az adott polimorfizmus rizikóallélját jelzi (r – rizikó; következő betű a rizikó allélnak tartott allél).

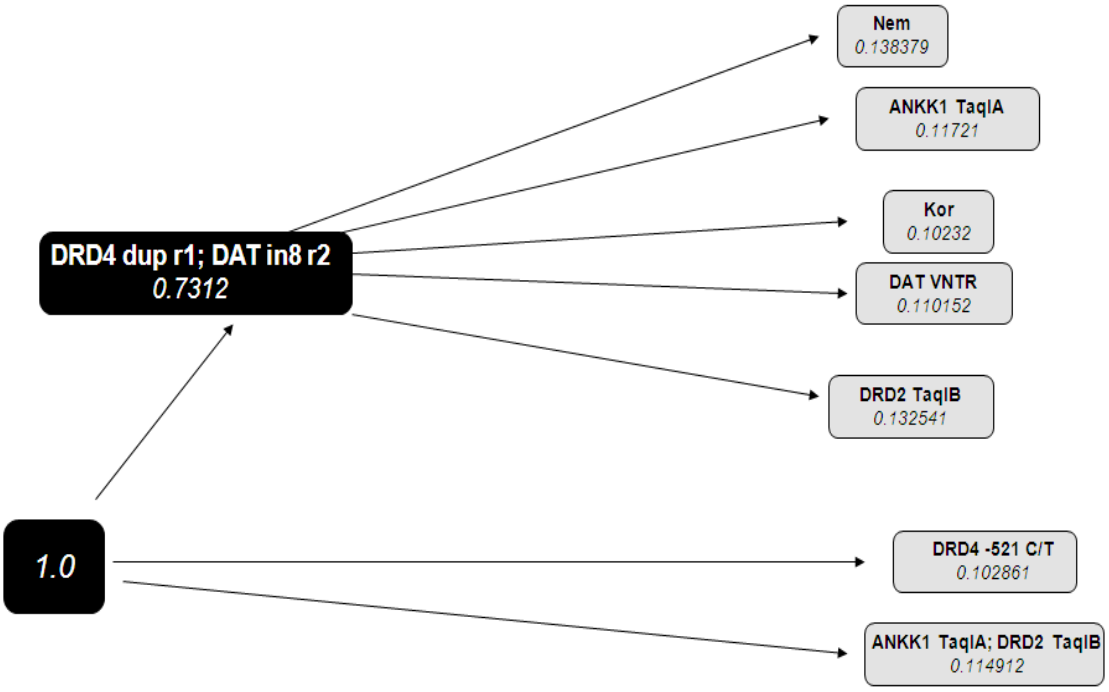
5.3. A SZUBSZTITÚCIÓS TERÁPIA ÉS A DOPAMINERG GÉNEK ASSZOCIÁCIÓ ANALÍZISE

A metadonkezelés hatékonyságát befolyásoló genetikai variánsok elemzését a korábbiaknak megfelelően hagyományos és BN-BMLA statisztikával is elvégeztük. A frekventista módszer Khi-négyzet elemzése nem hozott szignifikáns eredményt, ami valószínűség szerint az alacsony esetszámnak köszönhető (a terápiás válasz hatékonysága szerinti felbontásban a jól, illetve gyengén reagálók aránya viszonylag magas a kezelésből kiesők alacsony száma miatt). Többváltozós elemzés esetén a logisztikus regresszió során azonban ismét a dopaminerg rendszer hatása mutatkozott meg. Ez esetben a dopamin transzporter intron 8-as polimorfizmusa mutatott gyenge, de szignifikáns asszociációt a kezelésben részesülők terápiás válaszával (p=0,048; 17. táblázat). Többváltozós elemzés lévén ebben az esetben a kor is belép az elemzésbe, azonban a két változó között nincs kimutatható interakció.

17. táblázat - A logisztikus regresszió többváltozós elemzése során belépő változók a 3 hónapos kezelési hatékonyság vonatkozásában.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% Konf. int.	
							Alsó	Felső
SLC6A3_IN8_r2	-,975	,493	3,910	1	,048	,377	,143	,991
Kor	,152	,058	6,966	1	,008	1,164	1,040	1,304
Konstans	-2,058	1,540	1,787	1	,181	,128		

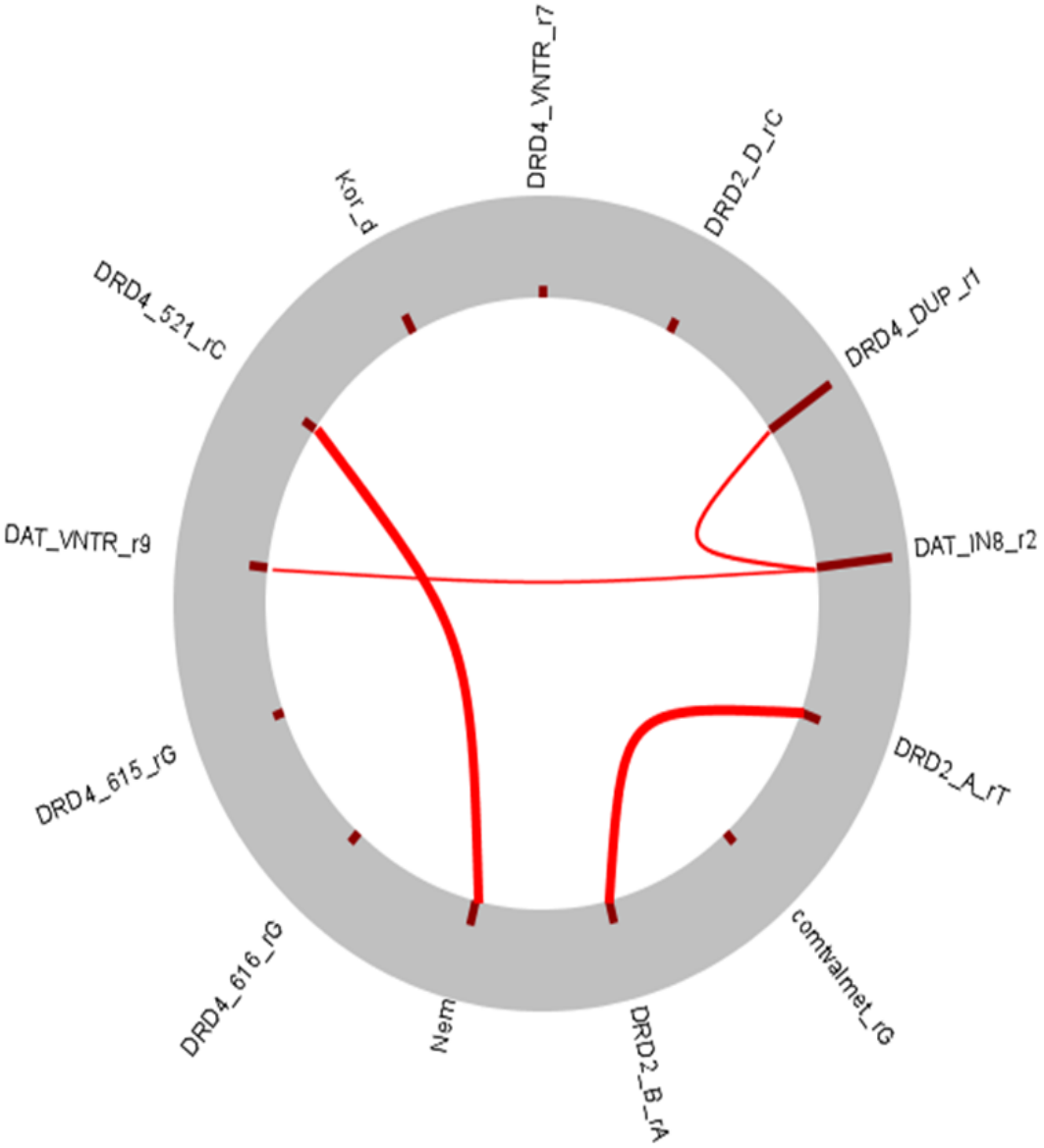
Az elvégzett BN-BMLA statisztikai elemzés megerősítette a hagyományos elemzéssel kapott eredményeinket. A modell legnagyobb valószínűséggel két változó belépését jelzi (7. ábra), ezek a dopamin D4-es receptor 120 bp duplikációja, valamint a dopamin transzporter intron 8-as polimorfizmusa. Üres modellből kiindulva a két változó együttes belépése tűnik a legjobb magyarázóerőnek (R=0,73), erősebb mint bármely változó önmagában nézve.



7. ábra - BN-BMLA többszintű relevancia elemzés modellje a relevancia értékekkel.

Ezen kívül bioinformatikus munkatársaink a BayesEye program segítségével elvégezték a változók közti lehetséges interakciók és redundanciák elemzését, melynek összefoglalását 8. ábrán lehet megtekinteni.

A szürke gyűrűben található piros oszlopok az adott variáns relevanciájára utalnak, melyből rögtön látható a dopamin transzporter intron 8-as és a dopamin D4-es receptorgén 120 bp duplikációjának kifejezett hatása, melyek közt a piros, vékony összekötő vonal a két variáns közti gyenge interakcióra utal. Ugyanilyen interakció figyelhető meg a két dopamin transzporter variáns között is, ám az interakciós VNTR partner nem bizonyult releváns hatásúnak a terápia kimenetelét befolyásoló tényezők között. Az ANKK1 *Taq*IA és a DRD2 *Taq*IB polimorfizmusa között nem meglepő módon egy erős interakció figyelhető meg, amely a kapcsoltsági adatokat figyelembe véve kézenfekvőnek tűnik. További érdekes interakció a DRD4 -521 C/T polimorfizmusának és a Nem változónak az interakciója, amely az alacsony mintaelemszám miatt további vizsgálatokat igényel.



8. ábra - A BN-BMLA többszintű relevancia elemzés eredményeinek összefoglaló kördiagramja az interakciók és redundanciák feltüntetésével.

Az eredmények bemutatását a külföldi tanulmányutam során elsajátított módszerekkel beállított fibroblaszt modellrendszer bemutatásával szeretném befejezni. Először a metabolikus stresszkezelés okozta mRNS expresszió változások, illetve a megváltozott expressziót mutató gének útvonalelemzését mutatnám be, majd rátérnék a miRNS változások, végül pedig a miRNS és mRNS változások közötti korrelációk elemzésére.

5.4. METABOLIKUS STRESSZ-INDUKÁLTA mRNS VÁLTOZÁSOK

Az mRNS génexpressziós chip 2063 megváltozott expressziót mutató génvariánst mutatott a glükóz megvonásos, galaktóz-tartalmú médiummal kezelt csoportban (GAL) a kontrollokhoz képest. Ezek közül 1117 (54,1%) felülszabályozott, 946 (45,9%) pedig alulszabályozást mutatott [231]. Ezen szabályozott géntermékek különböző útvonalakban vesznek részt, úgymint: sejtciklus, apoptózis, gyulladásos válasz és mRNS termelés, metabolikus adaptáció. A lipidcsökkentett, koleszterin-szegény médiummal történő kezelés szintén erős hatást gyakorolt a transzkriptómra. A lipidcsökkentés 984 géntranszkriptum expresszióját érintette, 640 mRNS esetén az expresszió növekedett (65,0%), 344 transzkript esetében csökkent (35,0%) [231].

A minták további elemzésére kétutas hierarchikus klaszterezést alkalmaztunk, amely elemzés során a minták mind a galaktóz-kezelésben, mind a lipidcsökkentett médiumos kezelésben szépen elkülönültek a dendrogramm két oldalán a 10%-os, hagyományos médiumban növesztett sejtektől.

A megváltozott génexpressziót mutató mRNS-ek BioCarta adatbázison alapuló útvonal-analízise 19 transzkriptcsoport feldúsulását jelezte a galaktóz-kezelt csoportban (18A. táblázat), míg a lipidcsökkentés 12 útvonalnál jelzett feldúsulást és 3 esetben csökkenést (18B. táblázat) ($p < 0,05$). Gyakoriság-csökkenés esetén a NES értéke negatív értékként jelenik meg a táblázatban.

18. táblázat - A kétféle stresszkezelés során megváltozott expressziót mutató mRNS-ek BioCarta adatbázison alapuló útvonalanalízise során feldúsulást mutató útvonalak.

18A. táblázat - Galaktóz médium kezelés				**18B. táblázat - Lipidcsökkentett médium kezelés**			
Név	Méret	NES	p-érték	Név	Méret	NES	p-érték
RACCYCD*	26	1,93	0,000000	**PPARA***	56	1,80	0,000000
CELLCYCLE	23	1,83	0,000000	P38MAPK	39	1,56	0,009579
SRCRPTP	11	1,70	0,000000	VIP	26	1,60	0,009709
P53	16	1,70	0,002045	BAD	26	1,48	0,015936
TEL	18	1,73	0,010730	**CHREBP2***	42	1,64	0,022945
STATHMIN	19	1,57	0,011516	**RACCYCD***	26	1,65	0,027559
CFTR	12	1,65	0,012000	GCR	19	1,46	0,038000
CERAMIDE	22	1,67	0,012448	**HSP27***	15	1,49	0,040541
ATRBRCA	21	1,60	0,016129	CD40	15	1,58	0,044000
G2	24	1,59	0,026157	LYM	11	1,37	0,047714
HSP27*	15	1,47	0,026639	TNFR2	18	1,53	0,048583
CARM_ER	34	1,61	0,027451	TALL1	15	1,52	0,048638
PLCE	12	1,47	0,030864	IL22BP	16	-1,56	0,020638
CHREBP2*	42	1,61	0,031373	DNAFRAGMENT	10	-1,51	0,030488
AKAPCENTROSOME	15	1,53	0,031809	AHSP	11	-1,59	0,043222
CHEMICAL	22	1,56	0,032520				
RB	13	1,53	0,034137	A *-gal jelölt útvonalak mindkét kísérleti			
PPARA*	56	1,43	0,036000	beállításban feldúsulást mutattak.			
ATM	20	1,58	0,044807				

Megjegyzendő, hogy ezen útvonalak közül 4 mind a galaktóz-kezelt, mind a lipidcsökkentett kísérletes beállításban felülszabályozott: peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARA), carbohydrate response element binding protein 2 (CHREBP2), influence of Ras and Rho proteins on G1 to S Transition (RACCYCD) és a stress induction of HSP regulation (HSP27).

Az mRNS találatok validálására elvégeztük 10, lipid bioszintézisben szerepet játszó gén qPCR-es vizsgálatát, mely validálás eredményeként 10 génből 9 esetében a microarray eredményeinek megfelelő mértékű és irányú expresszió változást tapasztaltunk. A HMGCR esetében az irány ugyan megegyezett a microarray eredményével, azonban a változás nagysága nem érte el a szignifikancia szintjét.

5.5. METABOLIKUS STRESSZRE ADOTT miRNS EXPRESSZIÓS VÁLASZ

A miRNome miRNA PCR Array-eken végzett miRNS vizsgálat eredményeképp a humán fibroblasztokban 45 miRNS megváltozott expresszióját detektáltuk a galaktóz médiumos kezelési csoportban (20A. táblázat) ($|\Delta\Delta Ct| \geq 0{,}583$; $p \leq 0{,}05$), körülbelül ugyanannyi felülszabályozott, mint alulszabályozott miRNS-sel (24 és 21 miRNS). A táblázatokban mind a kontrollhoz viszonyított eltérések, mind ezen eltérések groupwise- és pairwise értékei láthatóak. Az adott miRNS-ek esetén pedig a másik kezelési csoport kontrollhoz képesti eltérései is megfigyelhetőek az expresszió változás irányát és nagyságát nyomonkövetendő. A lipidcsökkentés 34 miRNS-t befolyásolt, kifejezettebb alulszabályozással a felülszabályozáshoz képest (27 kontra 4 miRNS) (20B. táblázat).

A két metabolikus stresszkezelés során 4 miRNS mutatott átfedően szignifikáns expresszió változást a kontroll csoporthoz viszonyítva (19. táblázat), így az általuk lehetségesen befolyásolt mRNS-ek képezték a keresésünk fő vonalát. A miRDB online adatbázist átkutatva állítottunk össze egy listát a lehetséges célpontokkal.

19. táblázat - A két metabolikus stresszkezelés során átfedően szignifikáns expresszió változást mutató miRNS-ek.

	GAL-STD			RL-STD		
miRNS ID	**ddCt**	**gpval**	**ppval**	**ddCt**	**gpval**	**ppval**
hsa-miR-146b-5p	**1,058**	0,007	0,011	**1,487**	0,015	0,005
hsa-miR-129-3p	**0,949**	0,011	0,050	**1,108**	0,020	0,050
hsa-miR-543	**0,659**	0,025	0,020	**0,610**	0,021	0,035
hsa-miR-550a	**-1,054**	0,031	0,025	**-1,236**	0,025	0,039

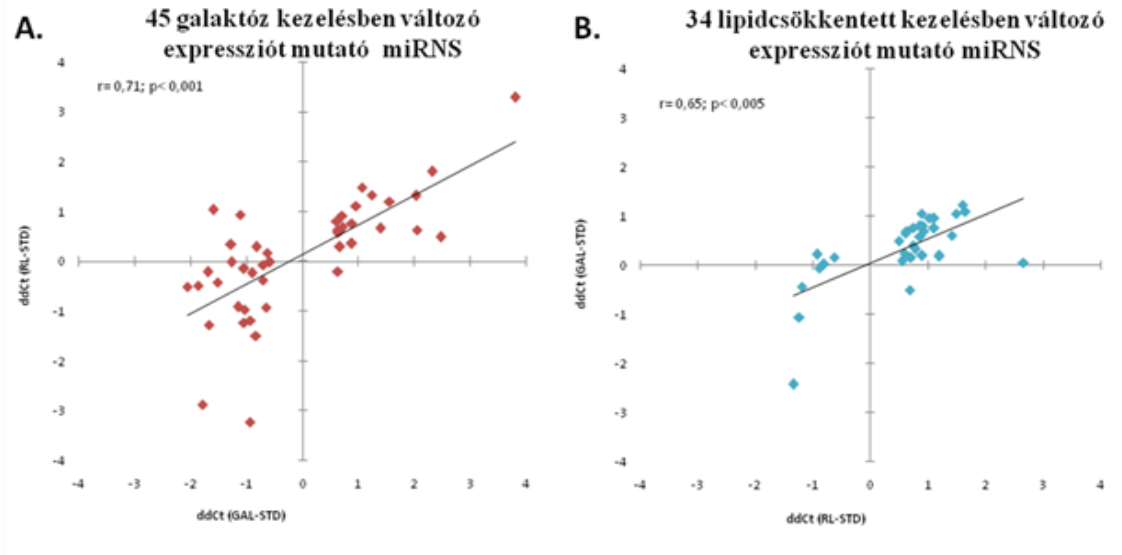
20A. táblázat - Galaktóz-indukálta miRNS expressziós változások és expressziójuk lipidcsökkentett kísérleti beállításban.

miRNS ID	ddCt (GAL-STD)	gt-test (GAL-STD)	pt-test (GAL-STD)	ddCt (RL-STD)	gt-test (RL-STD)	pt-test (RL-STD)
hsa-miR-378b	**-2,065**	**0,006**	**0,003**	-0,512	0,548	0,614
hsa-miR-1183	**-1,875**	**0,023**	**0,064**	-0,485	0,557	N/A
hsa-miR-429	**-1,801**	**0,019**	**0,154**	-2,877	N/A	N/A
hsa-miR-3682-3p	**-1,704**	**0,031**	**0,178**	-0,212	0,659	0,936
hsa-miR-187*	**-1,683**	**0,034**	**0,074**	-1,270	N/A	N/A
hsa-miR-4302	**-1,604**	**0,019**	**0,036**	1,038	0,143	0,067
hsa-miR-375	**-1,522**	**0,149**	**0,041**	-0,417	0,535	0,862
hsa-miR-3200-5p	**-1,283**	**0,041**	**0,128**	0,338	0,489	0,509
hsa-miR-3161	**-1,269**	**0,017**	**0,002**	-0,015	0,982	0,865
hsa-miR-4267	**-1,154**	**0,006**	**0,015**	-0,915	0,105	0,085
hsa-miR-378	**-1,115**	**0,057**	**0,040**	0,935	0,169	0,183
hsa-miR-3156-5p	**-1,055**	**0,022**	**0,034**	-0,148	0,723	0,870
hsa-miR-550a	**-1,054**	**0,031**	**0,025**	-1,236	0,025	0,039
hsa-miR-4257	**-1,044**	**0,020**	**0,327**	-0,972	0,227	0,436
hsa-miR-3159	**-0,943**	**0,142**	**0,037**	-3,222	0,299	0,325
hsa-miR-550a*	**-0,941**	**0,042**	**0,133**	-1,192	0,130	0,072
hsa-miR-720	**-0,903**	**0,090**	**0,023**	-0,236	0,588	0,335
hsa-miR-2278	**-0,839**	**0,287**	**0,035**	-1,490	0,155	0,169
hsa-miR-3907	**-0,827**	**0,070**	**0,013**	0,291	0,436	0,343
hsa-miR-3687	**-0,717**	**0,042**	**0,011**	-0,370	0,567	0,648
hsa-miR-532-3p	**-0,709**	**0,062**	**0,029**	-0,069	0,820	0,757
hsa-miR-3190	**-0,658**	**0,430**	**0,050**	-0,930	0,242	0,572
hsa-miR-1247	**-0,645**	**0,450**	**0,022**	0,177	0,803	0,800
hsa-miR-3647-3p	**-0,590**	**0,011**	**0,048**	-0,017	0,949	0,960
hsa-miR-301a	**0,602**	**0,038**	**0,025**	0,802	0,070	0,060
hsa-miR-369-3p	**0,612**	**0,029**	**0,030**	0,575	0,052	0,025
hsa-miR-874	**0,616**	**0,313**	**0,002**	0,632	0,398	0,277
hsa-miR-486-5p	**0,626**	**0,279**	**0,029**	-0,196	0,754	0,680
hsa-miR-543	**0,659**	**0,025**	**0,020**	0,610	0,021	0,035
hsa-miR-1260b	**0,660**	**0,077**	**0,049**	0,290	0,459	0,431
hsa-miR-424	**0,698**	**0,061**	**0,011**	0,919	0,104	0,052
hsa-miR-127-5p	**0,713**	**0,069**	**0,045**	0,696	0,120	0,114
hsa-miR-3913-5p	**0,757**	**0,343**	**0,031**	N/A	N/A	N/A
hsa-miR-628-5p	**0,871**	**0,020**	**0,067**	0,355	0,440	0,552
hsa-miR-181a*	**0,876**	**0,039**	**0,014**	0,759	0,213	0,146
hsa-miR-129-3p	**0,949**	**0,011**	**0,053**	1,108	0,020	0,051
hsa-miR-146b-5p	**1,058**	**0,007**	**0,011**	1,487	0,015	0,005
hsa-miR-1271	**1,227**	**0,032**	**0,113**	1,338	0,171	0,339
hsa-miR-1285	**1,386**	**0,010**	**0,037**	0,667	0,407	0,517
hsa-miR-337-5p	**1,550**	**0,017**	**0,103**	1,200	0,060	0,061
hsa-miR-217	**2,018**	**0,112**	**0,013**	1,323	0,097	0,223
hsa-miR-3176	**2,041**	**0,018**	**0,009**	0,635	0,373	0,515
hsa-miR-497*	**2,313**	**0,040**	**0,079**	1,803	0,098	0,204
hsa-miR-1227	**2,462**	**0,014**	**0,113**	0,488	0,343	0,172
hsa-miR-146b-3p	**3,795**	**0,046**	**0,123**	3,291	0,216	0,205

20B. táblázat - A lipidcsökkentés-indukálta miRNS expressziós változások és expressziójuk a galaktóz médiumos kísérleti beállításban.

miRNS ID	ddCt (RL-STD)	gt-test (RL-STD)	pt-test (RL-STD)	ddCt (GAL-STD)	gt-test (GAL-STD)	pt-test (GAL-STD)
hsa-miR-3154	**-1,342**	**0,039**	**0,047**	-2,425	0,161	0,267
hsa-miR-550a	**-1,236**	**0,025**	**0,039**	**-1,054**	0,031	0,025
hsa-miR-16-1*	**-1,181**	**0,014**	**0,063**	-0,437	0,347	0,311
hsa-miR-138-1*	**-0,924**	**0,326**	**0,021**	0,219	0,775	0,712
hsa-miR-641	**-0,887**	**0,042**	**0,253**	-0,059	0,875	0,726
hsa-miR-2110	**-0,805**	**0,043**	**0,031**	0,017	0,953	0,965
hsa-miR-320e	**-0,618**	**0,032**	**0,118**	0,162	0,384	0,513
hsa-miR-376c	**0,493**	**0,039**	**0,027**	0,490	0,114	0,050
hsa-miR-296-5p	**0,561**	**0,011**	**0,018**	0,085	0,736	0,623
hsa-miR-517*	**0,595**	**0,099**	**0,013**	0,245	0,475	0,375
hsa-miR-543	**0,610**	**0,021**	**0,035**	**0,659**	0,025	0,020
hsa-miR-214	**0,636**	**0,006**	**0,032**	0,703	0,088	0,075
hsa-miR-195	**0,689**	**0,011**	**0,061**	0,163	0,600	0,586
hsa-miR-18a*	**0,692**	**0,057**	**0,014**	-0,504	0,238	0,141
hsa-miR-19a	**0,710**	**0,103**	**0,035**	0,168	0,660	0,323
hsa-miR-212	**0,742**	**0,031**	**0,032**	0,404	0,155	0,078
hsa-miR-132*	**0,753**	**0,120**	**0,002**	0,766	0,122	0,292
hsa-miR-411	**0,779**	**0,016**	**0,066**	0,331	0,391	0,410
hsa-miR-330-5p	**0,854**	**0,117**	**0,007**	0,797	0,261	0,347
hsa-miR-431	**0,864**	**0,023**	**0,004**	0,579	0,063	0,016
hsa-miR-154*	**0,891**	**0,008**	**0,115**	1,052	0,087	0,110
hsa-miR-18a	**0,900**	**0,039**	**0,029**	0,198	0,597	0,375
hsa-miR-29a*	**0,912**	**0,041**	**0,116**	0,801	0,085	0,220
hsa-miR-135b	**0,927**	**0,148**	**0,037**	0,698	0,395	0,249
hsa-miR-22*	**1,033**	**0,049**	**0,194**	0,966	0,083	0,339
hsa-miR-31	**1,105**	**0,004**	**0,012**	0,750	0,065	0,079
hsa-miR-129-3p	**1,108**	**0,020**	**0,051**	**0,949**	0,011	0,053
hsa-miR-758	**1,188**	**0,042**	**0,042**	0,199	0,672	0,608
hsa-miR-106b*	**1,193**	**0,035**	**0,229**	0,188	0,795	0,918
hsa-miR-299-3p	**1,414**	**0,048**	**0,109**	0,612	0,159	0,243
hsa-miR-146b-5p	**1,487**	**0,015**	**0,005**	**1,058**	0,007	0,011
hsa-miR-196b*	**1,599**	**0,025**	**0,034**	1,226	0,114	0,289
hsa-miR-21*	**1,647**	**0,003**	**0,019**	1,102	0,093	0,052
hsa-miR-331-5p	**2,660**	**0,010**	**0,041**	0,058	0,915	0,932

A teljes kezelésenkénti miRNS expressziós képeket tekintve, azaz az összes megváltozott expressziót mutató miRNS-t figyelembe véve elmondható, hogy a két stresszkezelés során az egyes miRNS expresszió változások végig erősen korreláltak: a galaktóz kezelésben megváltozott expressziót mutató miRNS-ek a lipidcsökkentett kezelés expressziós értékeihez hasonlítva erős szignifikáns korrelációt mutattak ($r=0,71$; $p<0,001$) (9A. ábra), tehát az expresszió változás iránya megegyezett mindkét kezelési mód esetén.

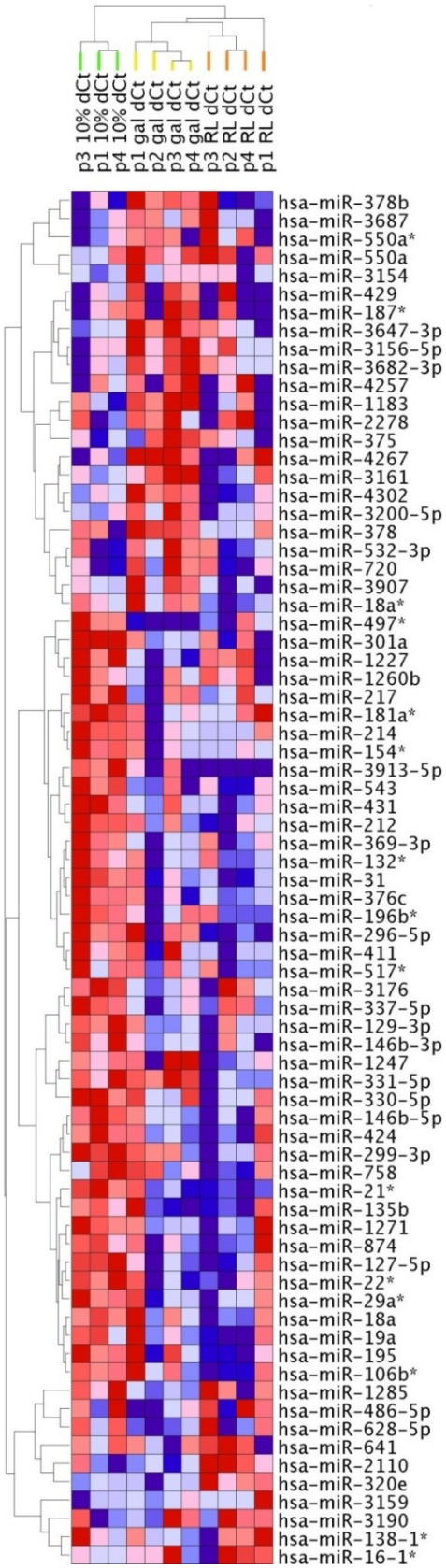


9. ábra - A miRNS expresszió változások korrelációja a galaktóz-kezelt miRNS-ek (A) és a lipidcsökkentett kezelésben résztvett sejtek (B) esetén.

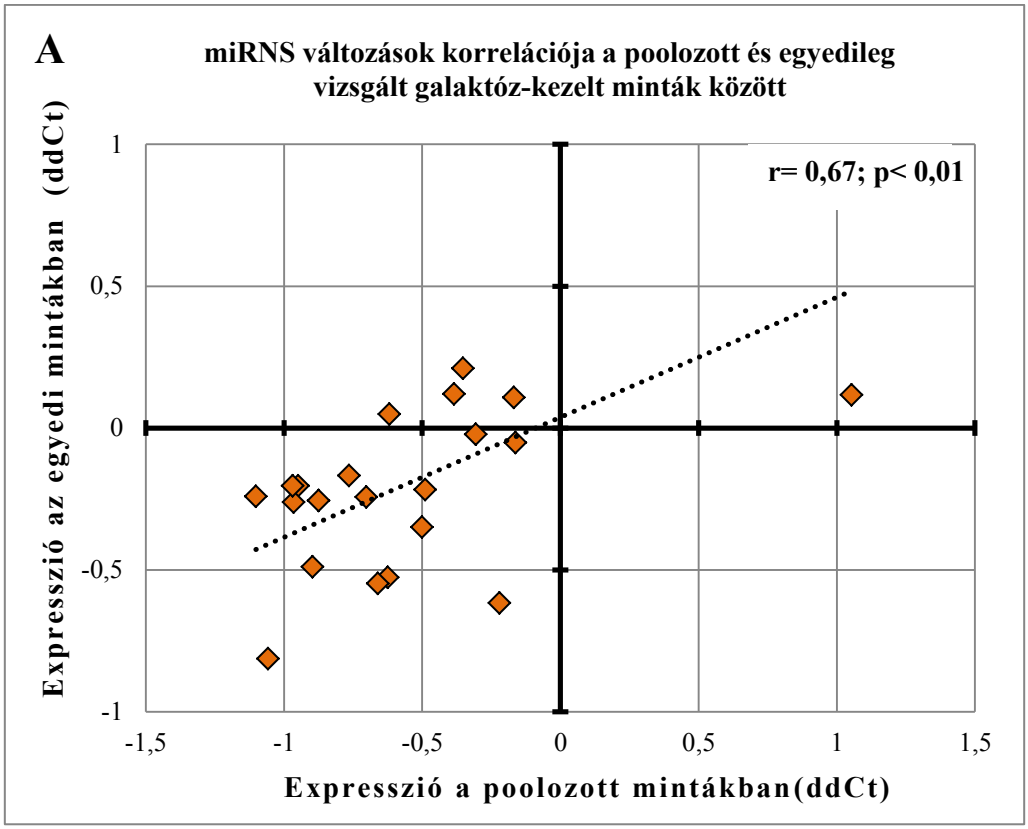
Hasonlóképp a lipidcsökkentés során változó miRNS expressziós kép erősen korrelál a galaktóz kezelés expressziós változásaival ($r=0,65$; $p < 0,005$) (9B. ábra).

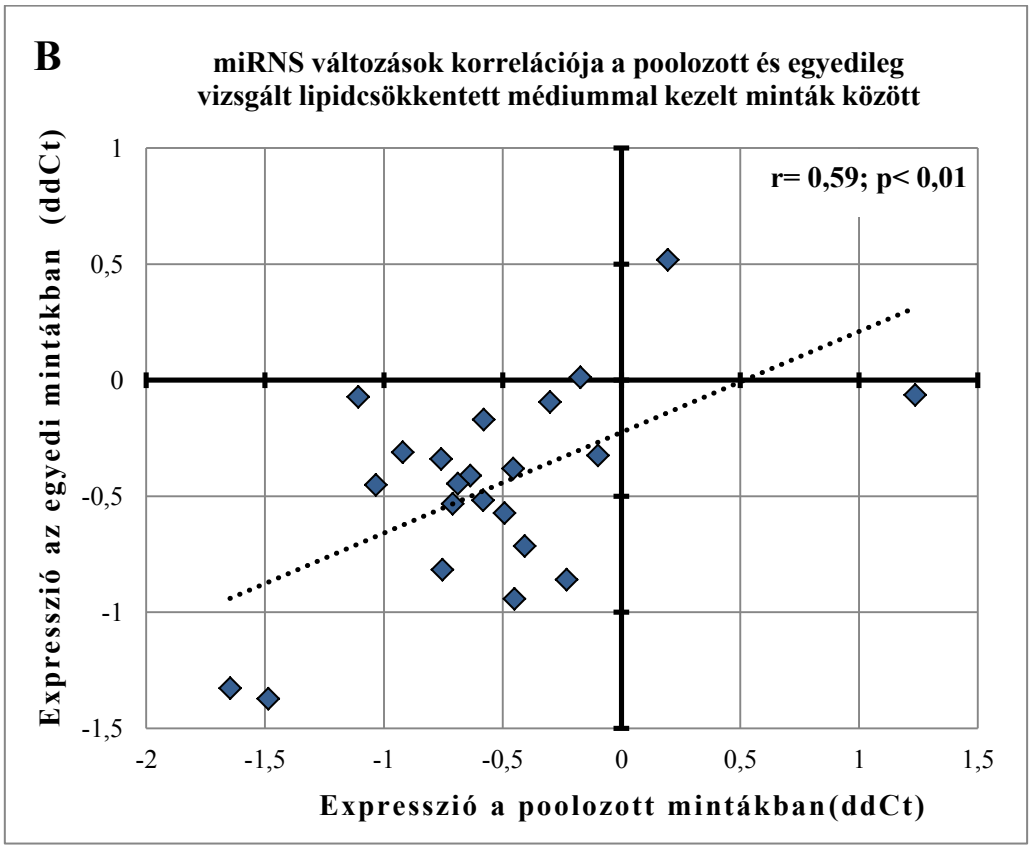
A következő lépésben az összes miRNS expresszió változást egy kétutas hierarchikus klaszterezésnek vetettük alá a GenePattern program használatával Euklidészi távolságot alkalmazva, melynek során a kontroll, a galaktóz-kezelt és a lipidcsökkentett kísérleti beállítás tökéletesen elkülöníthető volt (10. ábra). Ezen a hierarchikus klaszterezési dendrogrammon a zöld dendrogrammvégek a kontroll, a citromsárgák a galaktóz-kezelt, míg a narancsssárgák a lipidcsökkentett kísérleti beállítást jelölik. A különböző beállítások szerint a minták a dendrogrammon szépen elkülönültek. Így, habár a legnagyobb expresszió változást mutató miRNS-ek nem

voltak azonosak a galaktóz kezelési és lipidcsökkentett beállításnál, az egész mintázat azt sugallta, hogy a két nagyon különböző metabolikus stresszor hasonló miRNS választ vált ki a fibroblasztok esetében. Mivel a kezdeti elemzéseket 4 mintapoolon hajtottuk végre, amely elméletileg befolyásolhatta az adatainkat, ezért validálni kívántuk az eredményeket mind a 17 mintán, minden esetben 22 miRNS tesztelésével. Ebben az utánkövetéses vizsgálatban (11A. és 11B. ábrák) az eredeti poolozásból adódó miRNS eredményeink (X tengely) egybevágtak az egyes mintákon külön-külön megfigyelt expressziós mintázattal (Y tengely) (korreláció a galaktóz kezelésnél: $r=0,67$; $p < 0,01$, korreláció a lipidcsökkentett kezelésnél: $r=0,59$; $p < 0,01$).



10. ábra - A miRNS expresszió változások GenePattern programmal végzett kétutas hierarchikus klaszterezése során kapott dendrogram.





11. ábra - Expressziós és qPCR eredmények korrelációja galaktóz-kezelt (A) és lipidcsökkentett (B) kísérleti beállításban.

5.6. miRNS ÉS mRNS EXPRESSZIÓK KORRELÁCIÓJA

Hogy megvizsgáljuk, hogyan hatnak a metabolikus stressz-indukálta miRNS-ek az mRNS transzkriptómra, arra a 4 szignifikáns expresszió változást mutató miRNS-re fókuszáltunk, amelyek mind a galaktóz-kezelt, mind a lipidcsökkentett kezelési csoportban eredményt adtak (19. táblázat): a miR-129-3p, a miR-146b-5p, a miR-543 és a miR-550a. Hogy megtaláljuk ezen miRNS-ek mRNS célpontjait, a miRDB online adatbázist használtuk a lehetséges célpontok azonosítására. Az adatbáziskeresés 211 vélt célpontot adott a miR-129-3p, 243-at a miR146b-5p, 129-et a miR-550a és 921-et a miR-543 esetében. Az így összesített 1504 potenciális célpontból 140 mRNS mutatott szignifikáns változást vizsgálatunkban a génexpresszió szintjén. Érdemes megjegyezni, hogy a multiple célpont gének mind a galaktóz-kezelt, mind a lipidcsökkentett kísérletben szignifikáns expresszió változást mutattak humán fibroblasztokban, amely eredmény tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a két különböző metabolikus stressz hasonló hatást – jelen esetben miRNS expresszió változást - eredményez. Az ide kapcsolódó eredmények részletes bemutatására a diszkusszióban kerül sor.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1. A DOPAMINERG RENDSZER KANDIDÁNS GÉNJEI ÉS A HEROINFÜGGŐSÉG

A heroinfüggőséggel kapcsolatban a dopaminerg neurotranszmitter rendszer szerepe már hosszú idő óta áll a kutatások középpontjában, ám az irodalomban fellelhető eredmények ellentmondásos képet mutatnak. Egy genomszintű vizsgálatban a DRD4 gént is tartalmazó 11p kromoszóma régiót, mint a szerfüggőségre való hajlam egyik rizikóterületét azonosították [232]. A DRD4 gén polimorfizmusokban gazdag, egyik legismertebb variánsa a széles körben kutatott 48 bp VNTR a gén 3-as exonjában. Szerfüggőséggel először Kotler és mtsai. [233] hozták kapcsolatba, később többen replikálták az eredményüket [234,235], de több ellentmondó kutatási eredmény is napvilágot látott [236,237]. Jelenlegi vizsgálatunkban közép-európai, 303 beteg és 555 kontroll személyt magában foglaló mintánkban nem találtunk asszociációt a 48 bp VNTR és a heroinfüggőség között. A DRD4 gén promoter régiója szintén erősen polimorf, ebben a régióban találhatóak meg az általunk is vizsgált -521 C/T, -616 C/G és -615 A/G SNP-k, ez utóbbi leírása laborunk egy korábbi kutatásának eredménye [238]. Egy korábbi, kínai heroinfüggő mintán a -521 C/T polimorfizmussal végzett asszociáció vizsgálat [239] során nem találtak szignifikáns eltérést a kontroll populációhoz képest, habár egy nem-szignifikáns, tendenciózus növekedés volt megfigyelhető a -521 C allél és CC genotípus gyakoriságában az injekciós heroinhasználók körében. Ezzel szemben Lai és mtsai. erőteljes asszociációt mutattak ki a -521 SNP T allélja és a heroinfüggőség között ($p = 0,0002$), mely azt sugallja, hogy a DRD4 -521 C/T polimorfizmus TT genotípusával rendelkezők nagyobb valószínűséggel lesznek heroinhasználók [240]. Ez az eredmény összecseng az általunk kapott asszociáció eredményeivel, mely nominális szignifikanciát mutatott ($p = 0,007$) a -521 TT genotípus, mint a heroinfüggőség lehetséges rizikófaktora esetében. Ezen variáns függőség genetikájában betöltött szerepét laborunk korábbi heroin- [241] és nikotinfüggőséggel [242] végzett kutatásai mellett más csoportok is megerősítették [243]. Jelen kutatásban a többszörös tesztelés miatt alkalmazott Bonferroni korrekciót követően a -521 C/T szignifikáns hatása eltűnt és a promoter régió haplotípus elemzése sem hozott eredményt. Másrészről viszont a BN-BMLA analízis bevonásával megerősítettük a -521 C/T polimorfizmus asszociációját a heroinfüggőséggel, sőt a -615

A/G indirekt szerepére is fény derült. A DRD4 polimorfizmusokkal kapcsolatban bemutatott eredményekből is látszik, hogy az elemzések különbözőségéből is adódhatnak ellentmondások, hiszen a frekventista modell nem képes az interakciók tesztelésére, míg ugyanezen hatások a BN-BMLA analízissel kimutathatóvá váltak.

A -521 C/T és a drogfüggőség egyik rizikófaktora, az újdonságkeresés közti asszociációval kapcsolatban is születtek már korábban eredmények [244,245], melyek között laborunk egy korábbi közleménye is szerepel [244,245]. Ezen asszociáció analízist mások is elvégezték, de az eredmények nem mutattak egyértelmű képet, míg egy meta-analízis meg nem erősítette a -521 C/T újdonságkeresésben betöltött szerepét [246]. Ezen eredmények alátámasztani látszanak a BN-BMLA analízisünk eredményeit, habár a többszörös tesztelés miatti korrekció után negatív eredményt kaptunk a -521 C/T és újdonságkeresés közti asszociációra hagyományos statisztika alkalmazása mellett.

A DRD4 promoter régió polimorfizmusai a génexpresszió szabályozásában is szerepet játszhatnak: a -521 C/T egy in vitro vizsgálatban befolyásolta a promoter aktivitást [247]. Saját eredményeink is alátámasztani látszanak a 120 bp VNTR duplikált forma alacsonyabb transzkripciós aktivitását [248], ám a -521 C/T promoter aktivitást befolyásoló szerepére nem találtunk bizonyítékot [249].

Pszichológiai kérdőívek bevonásával a DRD4 48 bp VNTR 7-es ismétlődését (hosszú allélt) hordozók között magasabb újdonságkeresési potenciált mutattak ki a 7-es allélt nem hordozókhoz képest [250-253], habár az ezen eredményeket megerősíteni kívánó tanulmányok ellentmondó eredményeket hoztak (review: [254]). A magas újdonságkeresési pontszámokkal rendelkezők kutatások szerint hajlamosabbak a szerhasználatra [255-257]. Mindezek miatt a DRD4 gén 48 bp VNTR hosszú allélja a különböző addiktív magatartásformák esetében potenciális markerré vált. Lehetséges szerepét megerősítették alkoholisták [258], heroinfüggők [259] és evészavarral küzdők esetében [260], de a soron következő kutatások ellentmondó eredményei miatt továbbra sincs egyetértés a szakirodalomban a DRD4 VNTR szerepét illetően (review: [261]).

Az eredmények sikertelen reprodukálhatóságának egyik oka lehet a DRD4 gén nagy genetikai variabilitása. A DRD4 polimorf promoter régiójának molekuláris hatásairól (a 120 bp duplikáció, a −615 A/G, a −616 C/G és a −521 C/T) rengeteg kutatás készült, beleértve laborunk korábbi munkáit is [120,217,247,248,262,263]. Ezek

egyikében történt a -615 A/G SNP leírása, mely a -616 C/G genotipizálásának egyik szerencsés melléktermeke [238].

A szakirodalomban a függőséggel kapcsolatosan a legmeggyőzőbb eredmények a *Taq*IA polimorfizmussal kapcsolatban születtek. Egy kb. 40 tanulmányt feldolgozó meta-analízisben megerősítették a *Taq*IA ritka alléljának és az alkoholizmusnak az asszociációját, amely nem túl erős ugyan, de szignifikáns eredményt adott 1,22-es és 1,31-es esélyhányados értékekkel [264,265]. Feltételezhető volt, hogy más szerfüggőségek, mint pl. nikotinfüggőség, szerencsejáték-függőség is asszociációt mutathatnak a *Taq*IA polimorfizmussal, hisz ezen betegségek a jutalomhiányos szindróma hipotézise alapján hasonlóan manifesztálódhatnak [64]. Egy dohányzással kapcsolatban készült meta-analízis ugyan nem erősítette meg ezt a hipotézist [266], ám ópiátfüggőséggel végzett asszociáció vizsgálatok során magasabb heroinfogyasztást mutattak ki a ritka allélt hordozók esetében különböző nemzetiségi csoportokban [265]. Haplotípus elemzések során egyes haplotípus kombinációk esetében találtak még asszociációt pl. alkoholizmus [267,268], nikotin- [108] és heroinfüggőség [269] esetében, rávilágítva a haplotípus elemzések fontosságára.

Saját eredményeink leginkább a DRD2 és ANKK1 gének köré épülnek, ez utóbbi foglalja magában a széles körben kutatott *Taq*IA polimorfizmust, amelyet korábban a DRD2 gén egyik SNP-jeként tartottak számon. Egy spanyol tanulmány [270] a *Taq*IA lehetséges szerepét vizsgálta metadonkezelt heroinfüggő betegek körében. Egyes betegek más, nem-opioid jellegű szert is használtak, ez a szerhasználat azonban nem jelentette a betegek vizsgálatból való kizárását, lévén, hogy a dopamin D2-es receptor valószínűsíthetően egy nem-specifikus genetikai hajlamosító tényezője mind a szerhasználatnak, mind pedig a szerfüggőségnek.

Jelen eset-kontroll vizsgálatunk megerősíti a DRD2/ANKK1 heroinfüggőségben betöltött szerepét. Az eredmények a *Taq*IA A1A1 (ritkább) homozigóta genotípusa és a heroinfüggőség között egy nemektől független asszociációt mutatnak, habár az A1 allél önmagában nézve csak a férfiak esetében mutatott asszociációt. Egy 2009-es Han kínai domináns és kodomináns modelleket felhasználó vizsgálat szerint az ANKK1 *Taq*IA polimorfizmusának A1 alléljét hordozói hajlamosabbak a heroinhasználati zavar kialakítására [102], mely eredmény egybevág a jelen eredményeinkkel. A *Taq*IA polimorfizmus és a szerhasználati zavar közti asszociáció tesztelésére Young és mtsai.

vállalkoztak egy 55 vizsgálatot feldolgozó meta-analízis keretében [271]. Következtetéseik között szerepelt, hogy a *Taq*IA polimorfizmus A1 allélja prediktív markere a szerhasználati zavarnak és részben markere a súlyos szerhasználati betegségeknek. A vizsgálatban megközelítőleg tízezer személy mintáit dolgozták fel, így a statisztikai erőt figyelembe véve egy megbízható meta-analízisről beszélhetünk.

Vizsgálatunkban az ANKK1 *Taq*IA polimorfizmusának nominális szignifikanciáját (p = 0,009) mutattuk ki, mely hatás azonban eltűnt a Bonferroni korrekciót követően. Ezt az eredményt a BN-BMLA analízis is megerősítette, mely a többszörös tesztelésből adódó korrekció fontosságára is felhívja a figyelmet.

A széles körben vizsgált *Taq*IA mellett, az azzal szorosan kapcsolt DRD2 intron 1-es régiójában található *Taq*IB polimorfizmus és szerhasználattal összefüggő betegségek között viszonylag kevés asszociáció vizsgálat történt. A *Taq*IB szerepét korábban nikotinfüggőségben [272], kokainfüggőségben [273] és pszichostimulánsok használata esetén [274] mutatták ki, de tudomásunk szerint ez idáig heroinfüggőségben betöltött szerepét még senki sem erősítette meg. A hagyományos statisztikai elemzésünk eredményeképp a *Taq*IB variáns az egyedüli dopaminerg polimorfizmus, mely a Bonferroni korrekció után is szignifikánsnak mutatkozott (p=0,003). A BN-BMLA elemzés is hasonló eredményeket mutatott a DRD2 *Taq*IB esetén, ahol ezen SNP-t, mint a heroinfüggőség genetikai hátterében szerepet betöltő legrelevánsabb faktort hozta ki a vizsgált polimorfizmusok közül. Ezzel szemben a szomszédos, szorosan kapcsolt *Taq*IA-val szemben egy redundáns hatás és a *Taq*IA-nak egy alacsonyabb relevanciája volt megfigyelhető. Ezen eredmények alapján azt feltételeztük, hogy inkább a DRD2, mint az ANKK1 gén az, amely direkt hatással bír a heroinfüggőség kialakulásának genetikai hátterére. Limitáló tényező azonban, hogy vizsgálatunkba mindössze két DRD2 polimorfizmust (*Taq*IB és *Taq*ID) vontunk be, így indokoltnak látszik egy kiterjedtebb kapcsoltsági vizsgálatot végezni ebben a régióban, bevonva a szintén széles körben vizsgált Ser311Cys variánst is [275], mely a szakirodalomban, mint a skizofrénia lehetséges rizikófaktora szerepel.

A dopamin metabolizmusában (COMT) és transzportjában (SLC6A3 vagy DAT) résztvevő gének szintén a heroinfüggőség lehetséges kandidáns génjeinek listáját gazdagítják. A COMT szerepét a pszichiátriai betegségekkel kapcsolatban széles körben vizsgálták, de az eredmények a mai napig ellentmondásosak [276]. Skizofréniában

szenvedő betegek vizsgálata során kapcsolatot találtak a COMT Val158Met polimorfizmusának Met allélja és az impulzív agresszió [277], illetve a gyilkossági hajlam között [278]. Kábítószerrel kapcsolatos vizsgálatokat is végeztek a COMT genetikai variánsaival kapcsolatosan eset-kontroll beállításban, beteg és egészséges személyek genotípus-gyakoriságait összehasonlítva. A korai vizsgálatok során ugyan találtak kapcsolatot, de az eredményeket más populációk esetében gyakran nem tudták reprodukálni. A Val allél megnövekedett gyakoriságát figyelték meg polidrog és metamfetamin használók körében [279,280]. Egy kis mintaelemszámú ópiáthasználó mintán is kimutatták ezt az eredményt [281], amelyet azonban egy nagyobb mintaelemszámú eset-kontroll vizsgálatban már nem sikerült reprodukálni. További munkacsoportok is kapcsolatot találtak ópiátfüggőséggel [282], de csak nők esetében és ez a szignifikancia a többszörös statisztikai tesztelés után eltűnt. Ezek az eredmények valószínűsítik a Val allél (nagy aktivitású forma, amely alacsony szinaptikus dopamin-koncentrációban mutatkozik meg) kábítószer-függőségben betöltött lehetséges szerepét, egyetértésben a jutalomhiányos szindrómával. Ezzel szemben mások megnövekedett Met allél gyakoriságot találtak kokainhasználók esetében [283].

Az DAT (SLC6A3) két hosszúság polimorfizmusának, az intron 8 VNTR-nek és a 3' UTR régióban elhelyezkedő 40 bp VNTR-nek a szerepe már korábban is felvetődött függőségekkel kapcsolatban. Pozitív asszociációt találtak a 40 bp VNTR és a kokainfüggőség [134], az ADHD [135] és az alkoholizmus [136] között. Jelen vizsgálatunkban nem találtunk asszociációt sem a 40 bp VNTR, sem az intron 8 VNTR esetében statisztikai módszertől függetlenül.

A COMT gén exonikus Val158Met variánsát korábban különböző pszichiátriai betegségekkel hozták kapcsolatba (áttekintő review: Hosak, 2007 [276]), ám jelen kutatásunk nem hozott asszociációt egyik statisztikai módszer esetében sem.

Mint minden genetikai vizsgálatnak, a jelen vizsgálatnak is megvannak a maga korlátai. A viszonylag alacsony mintaelemszám és a populáció heterogenitása miatt fennáll az elsőfajú hiba (fals pozitív, type I) lehetősége. A kutatásban szereplő magyar minta homogénnek tűnik, a genotípus gyakoriságok pedig a kontroll csoportban megfelelnek a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Habár a populációs sztratifikáció elkerülése végett a család-alapú analízisek kerülnek mindinkább előtérbe, de ez a módszer szerfüggőséggel küzdő betegek esetében nehezen kivitelezhető, hiszen a

betegek jelentős része nem tartja a kapcsolatot a családdal. Ha viszont szigorúbb feltételekkel (pl. együttműködő, támogató család) vennénk be betegeket a vizsgálatba, nagy volna az esélye, hogy a legsúlyosabb esetek egyszerűen nem kerülnének bele a mintába és így befolyásolnák a vizsgálat kimenetelét [284]. További limitációt jelent, hogy a droghasználati múlt megállapítása önbevallás útján történt vizeletteszt nélkül. Annak ellenére, hogy az ANKK1 *Taq*IA polimorfizmusának A1 allélja asszociációt mutat a dohányzással [285,286], a dohányzás nem szerepelt kizáró tényezőként a vizsgálatba vonásnál, hiszen a heroinfogyasztók jelentős hányada él ezzel a szenvedéllyel. Mindezen tények figyelembe vételével további, magasabb esetszámmal és homogénebb populációval dolgozó kutatásra volna szükség a -521 C/T, a *Taq*IA és a *Taq*IB polimorfizmusok heroinfüggőség genetikájában betöltött szerepének tisztázásához.

A dopaminerg gének egyedi hatásait széleskörűen, sok kutatócsoport vizsgálta már, de a variánsok közötti interakciók tesztelésére kevés példát láthattunk. Vizsgálatunk nagy erősségének tartjuk, hogy a frekventista statisztikai módszer alkalmazása mellett a BN-BMLA statisztikai módszerrel lehetőségünk volt az egyes variánsok közötti kapcsolatok, így az interakciók és redundanciák heroinfüggőség kialakulásában betöltött szerepének tisztázására. A BN-BMLA módszer megerősítette a hagyományos statisztika eredményeként kapott DRD2 *Taq*IB releváns hatását, továbbá felfedte a DRD4 -615 A/G, mint új interakciós partner -521 C/T SNP-n keresztül megvalósuló indirekt hatását is.

6.2. A METADON TERÁPIA FARMAKOGENETIKAI VONATKOZÁSAI

A metadonkezelés kimenetelét befolyásoló genetikai tényezők vizsgálatánál az első feladat a terápiás válasz (methadone response) meghatározása volt. Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy nincs egy egzakt kezelési időtartam, amely elválasztaná a kezelésre jól reagálókat a nem, vagy rosszul reagáló betegektől. Klinikusok tapasztalatára hagyatkozva mi ezt a határt 3 hónapnál állapítottuk meg: jól reagáló az, aki a 3 hónap letelte után is a kezelésben marad és a methadon-terápia a rendes ütemben zajlik, míg gyengén reagál a kezelésre az, aki 3 hónapon belül kiesik a kezelésből és felfüggeszti a terápiát. A legtöbb kezelésből kieső beteg már az első 1 hónapban – azon belül is a legtöbben az első héten – abbahagyja a kezelést. Jelen kutatásunkban 3

hónapos határt szabtunk meg a kezelési hatékonyság megállapításához és így végeztük el a betegek csoportosítását jól reagáló (good responder) és gyengén reagáló (low responder) szempontok szerint.

A metadonkezelés kimenetelét befolyásoló genetikai tényezők közül elsősorban a dopamin rendszer szerepét emelhetjük ki. A dopamin D2-es receptorgén polimorfizmusai a legszélesebb körben vizsgált variánsok a kezelési hatékonyság tekintetében. A korábban dopamin D2-es polimorfizmusnak tartott *Taq*IA asszociációt mutatott a metadon terápia hatékonyságával egy ausztrál populációban [158]. Ebben a vizsgálatban 95 opioidfüggő beteg metadonkezelését követték nyomon több mint egy évig. A gyenge kezelési hatékonyság, amely a populáció 20%-át jellemezte, a végleges kezelésből kilépést vagy legalább heti rendszerességű heroinhasználatot jelentett a terápia helyett. Az A1 allél frekvenciája jelentősen magasabb volt a gyenge kezelési hatékonyságot mutató betegeknél és szignifikáns asszociációt mutatott a kezelésre jól reagálókkal szemben (42,1% vs. 9,3%; p = 0,00002). Egy másik tanulmányban 238 metadonnal kezelt beteg bevonásával nem találtak asszociációt az A1 allél és a metadonválasz között [287]. Azonban egy másik polimorfizmus, a *Taq*IA-val kapcsolt 957 C>T [288] esetén a CC genotípus nagyobb gyakorisággal fordult elő a nem reagálók között a jól reagálókhoz viszonyítva (p = 0,02). Nem reagálók azok, akik rendszeresen használtak heroint a kezelés alatt és 2 naponta legalább egy pozitív vizelettesztjük volt. Egy 85 fős metadonkezelt populáción DRD2/ANKK1 haplotípusok asszociációját mutatták ki heroinfüggőséggel és az alkalmazott metadondózissal [157]. A *Taq*IA szorosan kapcsolt az ANKK1 rs7118900 SNP-jéhez, ami egy alanin-treonin cserét okoz az ANKK1 239-es pozíciójában. Ez megváltozott sejtmag-citoplazma transzporthoz vezet és az apomorfinra, mint dopaminerg-agonistára [289] adott választ befolyásolhatja, ezáltal feltételezve egy lehetséges haplotípus-szintű funkcionális interakciót a DRD2 és az ANKK1 között.

Jelen kutatásunkban újfent a dopamin rendszer szerepe mutatkozott meg a dopamin D4-es receptor és a dopamin transzporter kezelési hatékonysággal asszociáló polimorfizmusai révén. A D4-es receptor 120 bp duplikációja és a dopamin transzporter intron 8-as polimorfizmusa mutatkozott a legrelevánsabb tényezőnek a statisztikai elemzés során, habár a hagyományos statisztika mindössze egy tendenciát mutatott az

intron 8 esetében, marginálisan szignifikáns nominális p-értékkel (p = 0,048). A gyenge asszociáció az alacsony mintaelemszám egyenes következménye is lehet, mivel a csoportosításból adódóan az összehasonlítandó csoportok esetszámainak aránya igen magas lett a jól reagálók magas aránya miatt.

A statisztikai elemzés során a fent említett két polimorfizmuson kívül a BN-BMLA elemzés a két dopamin transzporter polimorfizmus között egy interakciót is jelzett, ám az új interakciós partner alacsony relevanciát mutatott a metadonkezelést illetően. Mindazonáltal a dopamin transzporter polimorfizmusainak szerepe a jövőbeli kutatás szempontjából legalább annyira fontosnak tűnik, mint az elemzés során kapott DRD4 -521 C/T SNP és a nem közötti erős interakció természetének felderítése és további kutatása.

6.3. EXPRESSZIÓS MINTÁZATOK VIZSGÁLATA FIBROBLASZT MODELLBEN

A heroinfüggőség és metadonkezelés kutatása során alkalmazott eset-kontroll vizsgálatok mellett lehetőségem volt egy olyan biológiai modell beállítására is, mely esetleg alkalmas lehet a pszichiátriai rendellenességek molekuláris hátterének kutatásához, ezáltal pedig szöveti szinten is mérhetővé válhatnának az adott gének expressziós értékei. Alapvető hipotézisünk, hogy egészséges és beteg (pl. drogfüggő) személyekből származó fibroblaszt sejtkultúrák eltérő expressziós mintázatot adnak metabolikus stressz hatására, és ezen eltérések markerei lehetnek az idegrendszeri változásoknak. Microarray technológia segítségével hibridizációs technika felhasználásával képesek voltunk egyidőben több ezer géntranszkriptum expressziójának megfigyelésére.

Kutatásunk során egészséges személyektől származó fibroblaszt sejtkultúrákban azonosítottunk két különböző táplálék-alapú metabolikus stresszkezelés által kiváltott mRNS és miRNS expressziós változásokat. Fő konklúzióink között szerepel, hogy a glükóz-hiányos, galaktózzal kezelt és a lipidcsökkentett, koleszterin-hiányos médiummal való kezelés erős mRNS és miRNS változásokat okozott a kezelt humán fibroblaszt sejttenyészetekben. Habár a legszignifikánsabban változó miRNS-ek változatosságot mutattak a két kezelés között, az átfogó miRNS expresszió változások nagyfokú hasonlóságát figyelhettük meg a két metabolikus stresszkezelés során. Az

eredményekből úgy tűnik, hogy a miRNS expresszió változások jelentősen hozzájárulnak a megváltozott mRNS expressziós képhez mind a galaktózzal kezelt, mind a lipidcsökkentett beállításban. Négy szignifikáns változást mutató miRNS-t azonosítottunk (miR-129-3p, miR-146b-5p, miR-543 és miR-550a), amelyek mindkét kísérleti beállításban szignifikáns mértékű változást mutattak, és amelyek lehetséges mediátorai lehetnek a különböző típusú metabolikus stresszeknek.

A két kezelésben megfigyelhető miRNS változások átfogó képe nagyfokú hasonlóságot mutatott. Ezen felül négy metabolikus stresszel kapcsolatos útvonal (PPARA, CHREBP2, RACCYCD és HSP27) is felülszabályozást mutatott mind a galaktózzal kezelt, mind a lipidcsökkentett médiumnak kitett sejtkultúra esetében, mely azt sugallja, hogy ez a mintázat mind miRNS, mind pedig mRNS szinten megfigyelhető. Meglepő módon úgy tűnik, hogy a két stresszor különböző mechanizmusokkal működik, s míg a galaktózkezelés elsősorban éhezés útján bekövetkező oxidatív gyökök képződéséhez vezet [190], addig a lipidcsökkentett beállításban a sejtek egy metabolikus túlhasználtsági állapotot [202] mutatnak. Mindezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a hatástól függetlenül a metabolikus stressz hasonló hatást fejt ki mind a miRNS, mind pedig az mRNS szintjén és ez a közös mintázat egy olyan nem-specifikus adaptációs válasz, mely elősegíti a sejt túlélését. 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. A metabolikus stresszre adott válaszok alapján 4 miRNS-t azonosítottunk (miR-129-3p, miR-146b-5p, miR-543 és a miR-550a), melyek mRNS targetjei biológiailag relevánsnak tűnő útvonalakban vesznek részt, úgymint: sejtciklus, apoptózis, gyulladásos válasz és mRNS termelés, metabolikus adaptáció. Ezen eredményeink reményeink szerint alapot szolgáltatnak a stressz-indukálta fibroblaszt válasz további kutatásában pszichiátriai betegségek esetében is, úgymint a major depresszió vagy éppen a heroinfüggőség.

Eredményeink azt mutatják, hogy három megváltozott expressziót mutató miRNS önmagában képes 52 gén mRNS expressziójának szabályozására, mely azt sugallja, hogy a miRNS szabályozás jelentősen hozzájárul a stressz-indukálta

sejtválaszhoz. A miR-543 és miR-550a esetében kevés kísérletes eredmény áll rendelkezésre, így az általuk okozott hatásról még nincsenek ismereteink. Ezzel szemben a miR-129-2 és a miR-146b-5p esetében több adat is a rendelkezésünkre áll: a miR-129-2 egy CpG sziget mellett helyezkedik el és expressziója demetilációt okozó szerekkel epigenetikailag helyreállítható [290]. Ezen felül ez a miRNS gerincesekben konzervált és a sejt aktin dinamikáját befolyásolja olyan gének expressziójának szabályozása által, mint a CP110, az ARP2, a TOCA1, az ABLIM1 és az ABLIM3 [291]. A legfontosabb eredményünknek azonban a miR-146b-5p tűnik, mivel expressziója gyulladáskeltő citokinek által jelentősen indukálható, kiemelendően az IFN-γ által a JAK/STAT útvonalon keresztül [292,293]. Expressziójának csökkenését elhízásban monocita sejtekben figyelték meg és a gyulladáscsökkentő funkció csökkenésével hozták kapcsolatba [294]. Ezen felül a miR-146b-5p a TGF- β jelátvitelt is szabályozza [295] és úgy tűnik, hogy különböző ráktípusok patofiziológiájában is fontos szerepet játszik [296,297]. Ezen adatok alapján úgy tűnik, hogy a metabolikus stressz epigenetikai változásokon keresztül szabályozza a miRNS-ek expresszióját és hogy a két metabolikus stresszor egy gyulladásszerű választ vált ki a stressz-kezelt sejtekben. Természetesen ez a feltevés további kutatások szükségességére hívja fel a figyelmet.

A perifériás markerekkel végzett kutatások természetesen elengedhetetlenek a humán agyi betegségek patofiziológiájának megértéséhez. Kutatások szerint a perifériás biomarkerek segíthetnek a pszichiátriai betegségek diagnózisának felállításában és egy hatékonyabb kezelés megválasztásában [298]. Nehézséget jelent a perifériás szövetek begyűjtése, illetve, hogy a sejtek nyugalmi állapotban vizsgálva talán nem megfelelőek a betegség egyes fontos aspektusainak vizsgálatára, emiatt bizonyos fokú kezelés bevonására van szükség [190,299]. Az emberi bőrmintából származó fibroblasztok, mint lehetséges modellrendszer megfelelőnek tűnnek az ilyen típusú vizsgálatokhoz, mivel a perifériás vérsejtek funkcionális vizsgálatához képest számos előnnyel rendelkeznek: 1) egyszerűen szaporíthatók a sejtek korlátlan szaporodóképességének visszaállítása nélkül; 2) nagyobb hasonlóságot mutatnak az agysejtek expressziójával, mint a perifériás vérsejtek; 3) homogének és különböző kezelésekre igen jól válaszolnak; 4) epigenetikai változások által minimálisan befolyásoltak, amelyek az 5. passzázs után általában el is tűnnek. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a könnyen

hozzáférhető bőrfibroblaszt kultúrák jól ellenőrzött, reprodukálható funkcionális vizsgálatok kivitelezésére alkalmasak. Ez különösen fontos poligénes pszichiátriai betegségek vizsgálatakor, amikor limitált a posztmortem szövetek hozzáférhetősége és az állati modellek nem képesek az emberi betegség megfelelő modellezésére. Jelen vizsgálatunkban egészséges emberek fibroblaszt mintáit felhasználva igyekeztünk meghatározni a miRNS és mRNS szinten adott sejtválaszokat metabolikus stressz hatására. Természetesen hasonló vizsgálatokra lesz szükség betegminták felhasználásával, ahol a metabolikus stresszre adott válasz többet elárul majd az adott betegség patofiziológiájáról, mint egy nyugalmi állapotú sejt, egészséges eset-kontroll beállításban.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

1. A heroinfüggőség és a dopaminerg gének asszociáció analízisének eredményei azt mutatták, hogy az **általunk vizsgált dopaminerg gének releváns genetikai tényezői a heroinfüggőség kialakulásának**, mivel mind a DRD2, mind a DRD4 gének polimorfizmusai szignifikáns asszociációt mutattak a heroinfüggőség előfordulásával. A többszörös tesztelés miatt szükségessé vált **Bonferroni korrekciót követően csupán a DRD2 *Taq*IB polimorfizmus gyakoriság értékei mutattak szignifikáns eltérést a kontroll és a heroinfüggő csoportok között.**

2. A szakirodalomban a heroinfüggőség és a DRD2 gén asszociáció analízisében elsősorban a *Taq*IA polimorfizmusra koncentráltak és mutattak ki asszociációt, ugyanakkor saját eredményeink azt mutatták, hogy **a** DRD2 gén *Taq*IA polimorfizmusa nem, míg a DRD2 *Taq*IB polimorfizmusa a többszörös tesztelés után is szignifikáns eredményt adott, így tehát **vizsgálatunkban a *Taq*IB relevanciája a kiemelendő.**

3. Munkánk során először használtuk a BN-BMLA statisztikai analízist és 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 válaszának genetikai faktorait vizsgálva azt kaptuk, hogy a dopaminerg rendszer, azon belül pedig a dopamin transzporter és a dopamin D4-es receptor gén 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.

5. A metabolikus stressz vizsgálatában a fibroblaszt modellt alkalmazva jól mérhető stresszválaszt kaptunk a mRNS és a miRNS expressziós mintázatokban. **A kétféle metabolikus stressz a teljes miRNS expressziós mintázat vonatkozásában jelentős hasonlóságot mutatott**: a glükózmentes, galaktózzal dúsított médium kezelésben megváltozott expressziót mutató miRNS-ek azonos irányú expresszióváltozást mutattak a lipidcsökkentett, koleszterinmentes médiummal való kezelésben is. Hasonló helyzet mutatkozott a lipidcsökkentett, koleszterinmentes médiummal való kezelés során is, ahol a glükózmentes, galaktózzal dúsított médium kezelés expressziós értékei mutattak erős korrelációt a másik stresszor expressziós változásaival.

6. **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.**

7. **Ezen miRNS-ek** 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, gyulladásos válasz és mRNS termelés, metabolikus adaptáció.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A heroinfüggőség korunk jelentős társadalmi problémái közé tartozik. Irodalmi adatok a genetikai háttér fontosságát hangsúlyozzák, ezért kutatásunk célja a lehetséges genetikai háttértényezők felderítése volt. Ezen belül is az egyik legrelevánsabb tényezőt, az agy jutalmazó mechanizmusában szerepet játszó dopaminerg neurotranszmitter rendszert vizsgáltuk eset-kontroll beállításban. 303 heroinfüggő beteg és 555 kontroll személy bevonásával végeztük el kandidáns gén analízisünket, melynek keretében 11 polimorfizmus került elemzésre: az ANKK1 gén *Taq*IA polimorfizmusa, a dopamin D2-es receptorgén *Taq*IB és *Taq*ID polimorfizmusai, a dopamin D4-es receptorgén 3. exon hosszúság polimorfizmusa, 120 bp duplikációja és a promoter régió -521 C/T, -615 A/G, -616 C/G polimorfizmusai, a dopamin transzporter 3' UTR és intron 8 hosszúság polimorfizmusa, illetve a katekol-o-metiltranszferáz Val158Met polimorfizmusa. A statisztikai elemzés hagyományos és Bayes háló alapú bayesi többszintű relevancia elemzéssel történt. Eredményként az ANKK1 *Taq*IA polimorfizmusa, a D2-es receptorgén *Taq*IB polimorfizmusa és a D4-es receptorgén -521 C/T polimorfizmusa mutatott nominálisan szignifikáns asszociációt a heroinfüggőséggel, melyek közül a *Taq*IB a Bonferroni korrekciót követően is szignifikánsnak mutatkozott. A Bayes-i elemzés megerősítette ezen hagyományos statisztika eredményeit, továbbá feltárta a D4-es receptorgén -615 A/G polimorfizmusának -521 C/T-n keresztül megvalósuló indirekt hatását. A heroinfüggőség kialakulásában esetlegesen szerepet játszó genetikai tényezőkön kívül a betegség kezelésében alkalmazott metadon terápia hatékonyságában szerepet játszó tényezőket is igyekeztünk tesztelni. Az eredmények gyenge szignifikancia mellett a dopamin transzporter intron 8-as és a D4-es receptorgén 120 bp duplikációjának szerepére utaltak, ám a relatíve alacsony esetszámok miatt ezen vizsgálatunk további kutatást igényel. Munkám kiegészítéseképpen egy fibroblaszt modellrendszert is beállítottam egészséges személyek fibroblaszt sejtjeit használva, amelyeken különböző metabolikus stresszkezelést alkalmazva igyekeztem meghatározni a változó expressziót mutató miRNS és mRNS változásokat. Az eredmények a különböző stresszkezelések esetén hasonló stresszválaszra utalnak, amely eredmény a fibroblaszt sejtek stresszorra adott általános válaszát feltételezi, mely válasz során a miRNS-ek nagymértékben szerepet játszanak az mRNS-ek expressziójának szabályozásában.

9 SUMMARY

Nowadays heroin dependence is still a leading social problem. Literature data underscores the role of the genetic background, thus the goal of our research was to try discover possible genetic factors. Since the dopaminergic system is one of the most important neurotransmitter systems in the mechanism of the brain reward mechanism, it is thought to be one of the most relevant factors in the pathomechanism of addiction. In our study we used a case-control design involving 303 heroin dependent patients and 555 healthy controls. Our analysis was carried out on 11 dopaminerg or dopaminerg-related gene polymorphisms: the ANKK1 *Taq*IA polymorphism, the dopamine D2 *Taq*IB and *Taq*ID polymorphisms, the dopamine D4 3. exon length polymorphism, 120 bp duplication and the -521 C/T, -615 A/G, -616 C/G polymorphisms in the promoter region, the dopamine transporter 3' UTR and intron 8 length polymorphism and the catechol-o-metiltransferase Val158Met length polymorphism. Two kinds of statistical analyses were carried out: a frequentist and a Bayesian network based Bayesian Multilevel Analysis of relevance. The regular analysis showed a nominal significance of the ANKK1 *Taq*IA polymorphism, the DRD4 -521 C/T polymorphism and the DRD2 *Taq*IB polymorphism in heroin dependence. After the Bonferroni correction only the *Taq*IB remained significant. The additional Bayes analysis validated the results of the Khi-square analysis, furthermore it revealed an indirect effect of the -615 A/G through the -521 C/T polymorphism. Along the genetic components of the heroin dependence we tried to seek for genetic factors playing role in the pathomechanism of the methadone subtitution therapy of heroin dependence, as well. The results showed a weak significance and tendency of the involvement of the dopamine D4 receptor gene 120 bp duplication and the dopamine trasporter intron 8 polymorphisms. Since the sample sizes were relatively low, further studies are needed to validate these results. As an additional work I set up a possible model system of healthy fibroblast cells as an appropriate model for testing psychiatric diseases. Different metabolic stressors were applied to determine mRNA and miRNA expression changes in the altered conditions. The results showed a similar metabolic stress response, which suggest a common response to stress of the fibroblast cells. Along this response miRNAs played a major role in the regulation of the expression of mRNAs.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Agrawal A, Lynskey MT. (2008) Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. Addiction, 103: 1069-1081.
2. Cami J, Farre M. (2003) Drug addiction. N Engl J Med, 349: 975-986.
3. Di Chiara G, Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A, 85: 5274-5278.
4. Maisonneuve IM, Kreek MJ. (1994) Acute tolerance to the dopamine response induced by a binge pattern of cocaine administration in male rats: an in vivo microdialysis study. J Pharmacol Exp Ther, 268: 916-921.
5. Pettit HO, Ettenberg A, Bloom FE, Koob GF. (1984) Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl), 84: 167-173.
6. Spangler R, Zhou Y, Maggos CE, Zlobin A, Ho A, Kreek MJ. (1996) Dopamine antagonist and "binge' cocaine effects on rat opioid and dopamine transporter mRNAs. Neuroreport, 7: 2196-2200.
7. Tsukada H, Kreuter J, Maggos CE, Unterwald EM, Kakiuchi T, Nishiyama S, Futatsubashi M, Kreek MJ. (1996) Effects of binge pattern cocaine administration on dopamine D1 and D2 receptors in the rat brain: an in vivo study using positron emission tomography. J Neurosci, 16: 7670-7677.
8. Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey SL, Logan J, Bendriem B, Christman D, et al. (1990) Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. Am J Psychiatry, 147: 719-724.
9. Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, Randesi M, Ho A, Kreek MJ. (2006) Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. J Endocrinol, 191: 137-145.
10. Zhou Y, Leri F, Cummins E, Hoeschele M, Kreek MJ. (2008) Involvement of arginine vasopressin and V1b receptor in heroin withdrawal and heroin seeking precipitated by stress and by heroin. Neuropsychopharmacology, 33: 226-236.
11. Balster RL. (1991) Drug abuse potential evaluation in animals. Br J Addict, 86: 1549-1558.

12. Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. Prog Neurobiol, 66: 285-306.
13. Laakso A, Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG. (2002) Experimental genetic approaches to addiction. Neuron, 36: 213-228.
14. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schutz G. (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. Nat Genet, 31: 47-54.
15. Goldstein RZ, Volkow ND. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. American Journal of Psychiatry, 159: 1642-1652.
16. Hyman SE, Malenka RC. (2001) Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. Nature Reviews Neuroscience, 2: 695-703.
17. Wentzel J, Roberts DF, Whalley LJ. (1982) HLA in manic-depressive psychosis. Psychol Med, 12: 275-278.
18. Fox HC, Talih M, Malison R, Anderson GM, Kreek MJ, Sinha R. (2005) Frequency of recent cocaine and alcohol use affects drug craving and associated responses to stress and drug-related cues. Psychoneuroendocrinology, 30: 880-891.
19. O'Malley SS, Krishnan-Sarin S, Farren C, Sinha R, Kreek MJ. (2002) Naltrexone decreases craving and alcohol self-administration in alcohol-dependent subjects and activates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Psychopharmacology (Berl), 160: 19-29.
20. Schluger JH, Bart G, Green M, Ho A, Kreek MJ. (2003) Corticotropin-releasing factor testing reveals a dose-dependent difference in methadone maintained vs control subjects. Neuropsychopharmacology, 28: 985-994.
21. Schluger JH, Borg L, Ho A, Kreek MJ. (2001) Altered HPA axis responsivity to metyrapone testing in methadone maintained former heroin addicts with ongoing cocaine addiction. Neuropsychopharmacology, 24: 568-575.
22. Oldendorf WH, Hyman S, Braun L, Oldendorf SZ. (1972) Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. Science, 178: 984-986.

23. Inturrisi CE, Schultz M, Shin S, Umans JG, Angel L, Simon EJ. (1983) Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. Life Sci, 33 Suppl 1: 773-776.
24. Selley DE, Cao CC, Sexton T, Schwegel JA, Martin TJ, Childers SR. (2001) mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. Biochem Pharmacol, 62: 447-455.
25. Boix F, Andersen JM, Morland J. (2013) Pharmacokinetic modeling of subcutaneous heroin and its metabolites in blood and brain of mice. Addiction Biology, 18: 1-7.
26. Johnson SW, North RA. (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. J Neurosci, 12: 483-488.
27. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. J Neurochem, 55: 1734-1740.
28. Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ. (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. Arch Gen Psychiatry, 63: 324-331.
29. Rolls ET, Burton MJ, Mora F. (1980) Neurophysiological analysis of brain-stimulation reward in the monkey. Brain Res, 194: 339-357.
30. Vizi ES, Palkovits M, Lendvai B, Baranyi M, Kovacs KJ, Zelles T. (2004) Distinct temperature-dependent dopamine-releasing effect of drugs of abuse in the olfactory bulb. Neurochem Int, 45: 63-71.
31. Caprioli D, Celentano M, Paolone G, Badiani A. (2007) Modeling the role of environment in addiction. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 31: 1639-1653.
32. Floresco SB, Magyar O. (2006) Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. Psychopharmacology (Berl), 188: 567-585.
33. Sesack SR, Grace AA. (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. Neuropsychopharmacology, 35: 27-47.
34. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. Physiol Rev, 78: 189-225.

35. Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. Ann N Y Acad Sci, 877: 412-438.

36. Xi ZX, Stein EA. (2002) GABAergic mechanisms of opiate reinforcement. Alcohol Alcohol, 37: 485-494.

37. Tsuang MT, Lyons MJ, Meyer JM, Doyle T, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin N, Toomey R, Eaves L. (1998) Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. Arch Gen Psychiatry, 55: 967-972.

38. Kendler KS, Jacobson KC, Prescott CA, Neale MC. (2003) Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins. Am J Psychiatry, 160: 687-695.

39. Gelernter J, Kranzler HR. (2009) Genetics of alcohol dependence. Hum Genet, 126: 91-99.

40. Ho MK, Tyndale RF. (2007) Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. Pharmacogenomics J, 7: 81-98.

41. Agrawal A, Lynskey MT. (2009) Candidate genes for cannabis use disorders: findings, challenges and directions. Addiction, 104: 518-532.

42. Burmeister M, McInnis MG, Zollner S. (2008) Psychiatric genetics: progress amid controversy. Nat Rev Genet, 9: 527-540.

43. Cichon S, Craddock N, Daly M, Faraone SV, Gejman PV, Kelsoe J, Lehner T, Levinson DF, Moran A, Sklar P, Sullivan PF. (2009) Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. Am J Psychiatry, 166: 540-556.

44. Uhl GR, Liu QR, Walther D, Hess J, Naiman D. (2001) Polysubstance abuse-vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. Am J Hum Genet, 69: 1290-1300.

45. Foroud T, Edenberg HJ, Goate A, Rice J, Flury L, Koller DL, Bierut LJ, Conneally PM, Nurnberger JI, Bucholz KK, Li TK, Hesselbrock V, Crowe R, Schuckit M, Porjesz B, Begleiter H, Reich T. (2000) Alcoholism susceptibility loci:

confirmation studies in a replicate sample and further mapping. Alcohol Clin Exp Res, 24: 933-945.

46. Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, Bennett PH, Goldman D. (1998) Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. Am J Med Genet, 81: 216-221.

47. Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, Foroud T, Hesselbrock V, Schuckit MA, Bucholz K, Porjesz B, Li TK, Conneally PM, Nurnberger JI, Jr., Tischfield JA, Crowe RR, Cloninger CR, Wu W, Shears S, Carr K, Crose C, Willig C, Begleiter H. (1998) Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. Am J Med Genet, 81: 207-215.

48. Straub RE, Sullivan PF, Ma Y, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Kadambi B, Sadek H, Silverman MA, Webb BT, Neale MC, Bulik CM, Joyce PR, Kendler KS. (1999) Susceptibility genes for nicotine dependence: a genome scan and followup in an independent sample suggest that regions on chromosomes 2, 4, 10, 16, 17 and 18 merit further study. Mol Psychiatry, 4: 129-144.

49. Drgon T, Johnson CA, Nino M, Drgonova J, Walther DM, Uhl GR. (2011) "Replicated" genome wide association for dependence on illegal substances: genomic regions identified by overlapping clusters of nominally positive SNPs. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 156: 125-138.

50. Drgon T, Zhang PW, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M, Uhl GR. (2010) Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. PLoS One, 5: e8832.

51. Johnson C, Drgon T, Liu QR, Walther D, Edenberg H, Rice J, Foroud T, Uhl GR. (2006) Pooled association genome scanning for alcohol dependence using 104,268 SNPs: validation and use to identify alcoholism vulnerability loci in unrelated individuals from the collaborative study on the genetics of alcoholism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 141B: 844-853.

52. Liu QR, Drgon T, Johnson C, Walther D, Hess J, Uhl GR. (2006) Addiction molecular genetics: 639,401 SNP whole genome association identifies many

"cell adhesion" genes. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 141B: 918-925.

53. Liu QR, Drgon T, Walther D, Johnson C, Poleskaya O, Hess J, Uhl GR. (2005) Pooled association genome scanning: validation and use to identify addiction vulnerability loci in two samples. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 11864-11869.
54. Uhl GR, Liu QR, Drgon T, Johnson C, Walther D, Rose JE. (2007) Molecular genetics of nicotine dependence and abstinence: whole genome association using 520,000 SNPs. BMC Genet, 8: 10.
55. Drgon T, Johnson C, Walther D, Albino AP, Rose JE, Uhl GR. (2009) Genome-wide association for smoking cessation success: participants in a trial with adjunctive denicotinized cigarettes. Mol Med, 15: 268-274.
56. Drgon T, Montoya I, Johnson C, Liu QR, Walther D, Hamer D, Uhl GR. (2009) Genome-wide association for nicotine dependence and smoking cessation success in NIH research volunteers. Mol Med, 15: 21-27.
57. Uhl GR, Drgon T, Liu QR, Johnson C, Walther D, Komiyama T, Harano M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iyo M, Iwata N, Yamada M, Sora I, Chen CK, Liu HC, Ujike H, Lin SK. (2008) Genome-wide association for methamphetamine dependence: convergent results from 2 samples. Arch Gen Psychiatry, 65: 345-355.
58. Uhl GR, Drgon T, Johnson C, Li CY, Contoreggi C, Hess J, Naiman D, Liu QR. (2008) Molecular genetics of addiction and related heritable phenotypes: genome-wide association approaches identify "connectivity constellation" and drug target genes with pleiotropic effects. Ann N Y Acad Sci, 1141: 318-381.
59. Yu Y, Kranzler HR, Panhuysen C, Weiss RD, Poling J, Farrer LA, Gelernter J. (2008) Substance dependence low-density whole genome association study in two distinct American populations. Hum Genet, 123: 495-506.
60. Lachman HM, Fann CS, Bartzis M, Evgrafov OV, Rosenthal RN, Nunes EV, Miner C, Santana M, Gaffney J, Riddick A, Hsu CL, Knowles JA. (2007) Genomewide suggestive linkage of opioid dependence to chromosome 14q. Hum Mol Genet, 16: 1327-1334.
61. Glatt SJ, Su JA, Zhu SC, Zhang R, Zhang B, Li J, Yuan X, Li J, Lyons MJ, Faraone SV, Tsuang MT. (2006) Genome-wide linkage analysis of heroin dependence in

Han Chinese: results from wave one of a multi-stage study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 141B: 648-652.

62. Nielsen DA, Ji F, Yuferov V, Ho A, Chen A, Levran O, Ott J, Kreek MJ. (2008) Genotype patterns that contribute to increased risk for or protection from developing heroin addiction. Mol Psychiatry, 13: 417-428.

63. Nielsen DA, Ji F, Yuferov V, Ho A, He C, Ott J, Kreek MJ. (2010) Genome-wide association study identifies genes that may contribute to risk for developing heroin addiction. Psychiatr Genet, 20: 207-214.

64. Comings DE, Blum K. (2000) Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. Prog Brain Res, 126: 325-341.

65. Robbins TW, Everitt BJ. (1999) Drug addiction: bad habits add up. Nature, 398: 567-570.

66. Koob GF, Volkow ND. (2010) Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology, 35: 217-238.

67. Bart G, Heilig M, LaForge KS, Pollak L, Leal SM, Ott J, Kreek MJ. (2004) Substantial attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with heroin addiction in central Sweden. Mol Psychiatry, 9: 547-549.

68. Kapur S, Sharad S, Singh RA, Gupta AK. (2007) A118g polymorphism in mu opioid receptor gene (oprm1): association with opiate addiction in subjects of Indian origin. J Integr Neurosci, 6: 511-522.

69. Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA. (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. Pharmacol Rev, 57: 1-26.

70. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. (2006) Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. Drug Alcohol Depend, 83: 262-268.

71. Glatt SJ, Bousman C, Wang RS, Murthy KK, Rana BK, Lasky-Su JA, Zhu SC, Zhang R, Li J, Zhang B, Li J, Lyons MJ, Faraone SV, Tsuang MT. (2007) Evaluation of OPRM1 variants in heroin dependence by family-based association testing and meta-analysis. Drug Alcohol Depend, 90: 159-165.

72. Levran O, Londono D, O'Hara K, Nielsen DA, Peles E, Rotrosen J, Casadonte P, Linzy S, Randesi M, Ott J, Adelson M, Kreek MJ. (2008) Genetic susceptibility to heroin addiction: a candidate gene association study. Genes Brain Behav, 7: 720-729.

73. Xuei X, Flury-Wetherill L, Bierut L, Dick D, Nurnberger J, Jr., Foroud T, Edenberg HJ. (2007) The opioid system in alcohol and drug dependence: family-based association study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 144B: 877-884.

74. Zhang H, Luo X, Kranzler HR, Lappalainen J, Yang BZ, Krupitsky E, Zvartau E, Gelernter J. (2006) Association between two mu-opioid receptor gene (OPRM1) haplotype blocks and drug or alcohol dependence. Hum Mol Genet, 15: 807-819.

75. Chen AC, LaForge KS, Ho A, McHugh PF, Kellogg S, Bell K, Schluger RP, Leal SM, Kreek MJ. (2002) Potentially functional polymorphism in the promoter region of prodynorphin gene may be associated with protection against cocaine dependence or abuse. Am J Med Genet, 114: 429-435.

76. Dahl JP, Weller AE, Kampman KM, Oslin DW, Lohoff FW, Ferraro TN, O'Brien CP, Berrettini WH. (2005) Confirmation of the association between a polymorphism in the promoter region of the prodynorphin gene and cocaine dependence. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 139B: 106-108.

77. Yehuda R. (2001) Biology of posttraumatic stress disorder. J Clin Psychiatry, 62 Suppl 17: 41-46.

78. Aisen PS, Pasinetti GM. (1998) Glucocorticoids in Alzheimer's disease. The story so far. Drugs Aging, 12: 1-6.

79. Gold PW, Chrousos GP. (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry, 7: 254-275.

80. Holsboer F, Barden N. (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. Endocr Rev, 17: 187-205.

81. Proudnikov D, Hamon S, Ott J, Kreek MJ. (2008) Association of polymorphisms in the melanocortin receptor type 2 (MC2R, ACTH receptor) gene with heroin addiction. Neurosci Lett, 435: 234-239.

82. Bjorklund A, Dunnett SB. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends Neurosci, 30: 194-202.

83. Smith Y, Villalba R. (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. Mov Disord, 23 Suppl 3: S534-547.

84. Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. Curr Opin Pharmacol, 5: 34-41.

85. Seamans JK, Yang CR. (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. Prog Neurobiol, 74: 1-58.

86. Robbins TW, Arnsten AF. (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. Annu Rev Neurosci, 32: 267-287.

87. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science, 299: 76.

88. Nielsen DA, Virkkunen M, Lappalainen J, Eggert M, Brown GL, Long JC, Goldman D, Linnoila M. (1998) A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. Arch Gen Psychiatry, 55: 593-602.

89. Nielsen DA, Barral S, Proudnikov D, Kellogg S, Ho A, Ott J, Kreek MJ. (2008) TPH2 and TPH1: association of variants and interactions with heroin addiction. Behav Genet, 38: 133-150.

90. Aubert R, Betoulle D, Herbeth B, Siest G, Fumeron F. (2000) 5-HT2A receptor gene polymorphism is associated with food and alcohol intake in obese people. Int J Obes Relat Metab Disord, 24: 920-924.

91. Hwu HG, Chen CH. (2000) Association of 5HT2A receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. Am J Med Genet, 96: 797-800.

92. Nakamura T, Matsushita S, Nishiguchi N, Kimura M, Yoshino A, Higuchi S. (1999) Association of a polymorphism of the 5HT2A receptor gene promoter region with alcohol dependence. Mol Psychiatry, 4: 85-88.

93. Proudnikov D, LaForge KS, Hofflich H, Levenstien M, Gordon D, Barral S, Ott J, Kreek MJ. (2006) Association analysis of polymorphisms in serotonin 1B

receptor (HTR1B) gene with heroin addiction: a comparison of molecular and statistically estimated haplotypes. Pharmacogenet Genomics, 16: 25-36.

94. Gade R, Muhleman D, Blake H, MacMurray J, Johnson P, Verde R, Saucier G, Comings DE. (1998) Correlation of length of VNTR alleles at the X-linked MAOA gene and phenotypic effect in Tourette syndrome and drug abuse. Mol Psychiatry, 3: 50-60.

95. Gerra G, Garofano L, Santoro G, Bosari S, Pellegrini C, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, Moi A, Brambilla F, Donnini C. (2004) Association between low-activity serotonin transporter genotype and heroin dependence: behavioral and personality correlates. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 126B: 37-42.

96. Tan EC, Yeo BK, Ho BK, Tay AH, Tan CH. (1999) Evidence for an association between heroin dependence and a VNTR polymorphism at the serotonin transporter locus. Mol Psychiatry, 4: 215-217.

97. Hallikainen T, Saito T, Lachman HM, Volavka J, Pohjalainen T, Ryynanen OP, Kauhanen J, Syvalahti E, Hietala J, Tiihonen J. (1999) Association between low activity serotonin transporter promoter genotype and early onset alcoholism with habitual impulsive violent behavior. Mol Psychiatry, 4: 385-388.

98. Lichtermann D, Hranilovic D, Trixler M, Franke P, Jernej B, Delmo CD, Knapp M, Schwab SG, Maier W, Wildenauer DB. (2000) Support for allelic association of a polymorphic site in the promoter region of the serotonin transporter gene with risk for alcohol dependence. Am J Psychiatry, 157: 2045-2047.

99. Munafo MR, Lingford-Hughes AR, Johnstone EC, Walton RT. (2005) Association between the serotonin transporter gene and alcohol consumption in social drinkers. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 135B: 10-14.

100. Turker T, Sodmann R, Goebel U, Jatzke S, Knapp M, Lesch KP, Schuster R, Schutz H, Weiler G, Stober G. (1998) High ethanol tolerance in young adults is associated with the low-activity variant of the promoter of the human serotonin transporter gene. Neurosci Lett, 248: 147-150.

101. Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggs AH, Cohn JB. (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. Jama, 263: 2055-2060.

102. Hou QF, Li SB. (2009) Potential association of DRD2 and DAT1 genetic variation with heroin dependence. Neurosci Lett, 464: 127-130.

103. Gelernter J, O'Malley S, Risch N, Kranzler HR, Krystal J, Merikangas K, Kennedy JL, Kidd KK. (1991) No association between an allele at the D2 dopamine receptor gene (DRD2) and alcoholism. Jama, 266: 1801-1807.

104. Noble EP. (2003) D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 116B: 103-125.

105. Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. (2004) Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. Hum Mutat, 23: 540-545.

106. Meylan E, Tschopp J. (2005) The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. Trends Biochem Sci, 30: 151-159.

107. Hoenicka J, Quinones-Lombrana A, Espana-Serrano L, Alvira-Botero X, Kremer L, Perez-Gonzalez R, Rodriguez-Jimenez R, Jimenez-Arriero MA, Ponce G, Palomo T. (2010) The ANKK1 gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. Biol Psychiatry, 67: 3-11.

108. Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Beuten J, Dupont RT, Inohara N, Li MD. (2009) Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. Neuropsychopharmacology, 34: 319-330.

109. Bontempi S, Fiorentini C, Busi C, Guerra N, Spano P, Missale C. (2007) Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. Endocrinology, 148: 2563-2570.

110. Fiorentini C, Guerra N, Facchetti M, Finardi A, Tiberio L, Schiaffonati L, Spano P, Missale C. (2002) Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. Mol Endocrinol, 16: 353-366.

111. Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall GC. (1999) Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. Mol Psychiatry, 4: 290-296.

112. Ritchie T, Noble EP. (2003) Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. Neurochem Res, 28: 73-82.

113. Ponce G, Perez-Gonzalez R, Aragues M, Palomo T, Rodriguez-Jimenez R, Jimenez-Arriero MA, Hoenicka J. (2009) The ANKK1 kinase gene and psychiatric disorders. Neurotox Res, 16: 50-59.

114. Elmer GI, Pieper JO, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK, Wise RA. (2002) Failure of intravenous morphine to serve as an effective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice. J Neurosci, 22: RC224.

115. Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature, 388: 586-589.

116. Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. (1992) Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. Nature, 358: 149-152.

117. Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. (1995) Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. J Neurochem, 65: 1157-1165.

118. Borroto-Escuela DO, Van Craenenbroeck K, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, Haegeman G, Agnati LF, Tarakanov AO, Fuxe K. (2011) Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. Biochem Biophys Res Commun, 404: 928-934.

119. Schoots O, Van Tol HH. (2003) The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression. Pharmacogenomics J, 3: 343-348.

120. D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ, Craig IW. (2004) Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'flanking region of the DRD4 gene. Biol Psychiatry, 56: 691-697.

121. Mannisto PT, Kaakkola S. (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. Pharmacol Rev, 51: 593-628.

122. Kibitov AO, Voskoboeva E, Brodianskii VM, Chuprova NA, Smirnova EV. (2010) [Association study of the Val158Met polymorphism of the catechol-O-

methyltransferase gene and alcoholism and heroin dependence: the role of a family history]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 110: 84-88.

123. Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. (1994) Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. Eur J Biochem, 223: 1049-1059.

124. Tunbridge EM, Weickert CS, Kleinman JE, Herman MM, Chen J, Kolachana BS, Harrison PJ, Weinberger DR. (2007) Catechol-o-methyltransferase enzyme activity and protein expression in human prefrontal cortex across the postnatal lifespan. Cereb Cortex, 17: 1206-1212.

125. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J. (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. Biochemistry, 34: 4202-4210.

126. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. (1996) Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. Pharmacogenetics, 6: 243-250.

127. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. Am J Hum Genet, 75: 807-821.

128. Kaenmaki M, Tammimaki A, Myohanen T, Pakarinen K, Amberg C, Karayiorgou M, Gogos JA, Mannisto PT. (2010) Quantitative role of COMT in dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice. J Neurochem, 114: 1745-1755.

129. Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. (2006) Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. Biol Psychiatry, 60: 141-151.

130. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR. (2001) Effect of COMT Val108/158 Met genotype

on frontal lobe function and risk for schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 6917-6922.

131. Mattay VS, Goldberg TE, Fera F, Hariri AR, Tessitore A, Egan MF, Kolachana B, Callicott JH, Weinberger DR. (2003) Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 6186-6191.

132. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature, 379: 606-612.

133. Vandenbergh DJ, Persico AM, Uhl GR. (1992) A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs. Brain Res Mol Brain Res, 15: 161-166.

134. Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, Craig I, O'Gara C, Bubb VJ, Greenwood T, Kelsoe J, Asherson P, Murray RM, Castelo A, Quinn JP, Vallada H, Breen G. (2006) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. Proc Natl Acad Sci U S A, 103: 4552-4557.

135. Dresel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbaumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K. (2000) Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [99mTc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. Eur J Nucl Med, 27: 1518-1524.

136. Ueno S, Nakamura M, Mikami M, Kondoh K, Ishiguro H, Arinami T, Komiyama T, Mitsushio H, Sano A, Tanabe H. (1999) Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. Mol Psychiatry, 4: 552-557.

137. Gerra G, Garofano L, Pellegrini C, Bosari S, Zaimovic A, Moi G, Avanzini P, Talarico E, Gardini F, Donnini C. (2005) Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism with antisocial behaviour in heroin-dependent patients. Addict Biol, 10: 275-281.

138. Dole VP, Nyswander M. (1965) A Medical Treatment for Diacetylmorphine (Heroin) Addiction. a Clinical Trial with Methadone Hydrochloride. Jama, 193: 646-650.

139. D'Aunno T, Vaughn TE. (1992) Variations in methadone treatment practices. Results from a national study. Jama, 267: 253-258.

140. Dole VP, Nyswander ME, Kreek MJ. (1966) Narcotic blockade. Arch Intern Med, 118: 304-309.

141. Kreek MJ. (1973) Medical safety and side effects of methadone in tolerant individuals. Jama, 223: 665-668.

142. Kreek MJ. (2000) Methadone-related opioid agonist pharmacotherapy for heroin addiction. History, recent molecular and neurochemical research and future in mainstream medicine. Ann N Y Acad Sci, 909: 186-216.

143. Gossop M, Marsden J, Stewart D, Lehmann P, Edwards C, Wilson A, Segar G. (1998) Substance use, health and social problems of service users at 54 drug treatment agencies. Intake data from the National Treatment Outcome Research Study. Br J Psychiatry, 173: 166-171.

144. Marsch LA. (1998) The efficacy of methadone maintenance interventions in reducing illicit opiate use, HIV risk behavior and criminality: a meta-analysis. Addiction, 93: 515-532.

145. Maxwell S, Shinderman M. (1999) Optimizing response to methadone maintenance treatment: use of higher-dose methadone. J Psychoactive Drugs, 31: 95-102.

146. Strain EC, Bigelow GE, Liebson IA, Stitzer ML. (1999) Moderate- vs high-dose methadone in the treatment of opioid dependence: a randomized trial. Jama, 281: 1000-1005.

147. Alterman AI, Kampman K, Boardman CR, Cacciola JS, Rutherford MJ, McKay JR, Maany I. (1997) A cocaine-positive baseline urine predicts outpatient treatment attrition and failure to attain initial abstinence. Drug Alcohol Depend, 46: 79-85.

148. Magura S, Rosenblum A, Fong C, Villano C, Richman B. (2002) Treating cocaine-using methadone patients: predictors of outcomes in a psychosocial clinical trial. Subst Use Misuse, 37: 1927-1955.

149. Cacciola JS, Alterman AI, Rutherford MJ, McKay JR, Mulvaney FD. (2001) The relationship of psychiatric comorbidity to treatment outcomes in methadone maintained patients. Drug Alcohol Depend, 61: 271-280.

150. Farrell M, Boys A, Bebbington P, Brugha T, Coid J, Jenkins R, Lewis G, Meltzer H, Marsden J, Singleton N, Taylor C. (2002) Psychosis and drug dependence: results from a national survey of prisoners. Br J Psychiatry, 181: 393-398.

151. Hung CC, Chiou MH, Huang BH, Hsieh YW, Hsieh TJ, Huang CL, Lane HY. (2011) Impact of genetic polymorphisms in ABCB1, CYP2B6, OPRM1, ANKK1 and DRD2 genes on methadone therapy in Han Chinese patients. Pharmacogenomics, 12: 1525-1533.

152. Levran O, O'Hara K, Peles E, Li D, Barral S, Ray B, Borg L, Ott J, Adelson M, Kreek MJ. (2008) ABCB1 (MDR1) genetic variants are associated with methadone doses required for effective treatment of heroin dependence. Hum Mol Genet, 17: 2219-2227.

153. Oneda B, Crettol S, Bochud M, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Monnat M, Preisig M, Eap CB. (2011) beta-Arrestin2 influences the response to methadone in opioid-dependent patients. Pharmacogenomics J, 11: 258-266.

154. de Cid R, Fonseca F, Gratacos M, Gutierrez F, Martin-Santos R, Estivill X, Torrens M. (2008) BDNF variability in opioid addicts and response to methadone treatment: preliminary findings. Genes Brain Behav, 7: 515-522.

155. Levran O, Peles E, Hamon S, Randesi M, Adelson M, Kreek MJ. (2011) CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction. Addict Biol, 18: 709-716.

156. Fonseca F, de la Torre R, Diaz L, Pastor A, Cuyas E, Pizarro N, Khymenets O, Farre M, Torrens M. (2011) Contribution of cytochrome P450 and ABCB1 genetic variability on methadone pharmacokinetics, dose requirements, and response. PLoS One, 6: e19527.

157. Doehring A, Hentig N, Graff J, Salamat S, Schmidt M, Geisslinger G, Harder S, Lotsch J. (2009) Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or function modulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution. Pharmacogenet Genomics, 19: 407-414.

158. Lawford BR, Young RM, Noble EP, Sargent J, Rowell J, Shadforth S, Zhang X, Ritchie T. (2000) The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment. Am J Med Genet, 96: 592-598.

159. Fonseca F, Gratacos M, Escaramis G, De Cid R, Martin-Santos R, Fernandez-Espejo E, Estivill X, Torrens M. (2010) Response to methadone maintenance treatment is associated with the MYOCD and GRM6 genes. Mol Diagn Ther, 14: 171-178.

160. Lotsch J, Pruss H, Veh RW, Doehring A. (2010) A KCNJ6 (Kir3.2, GIRK2) gene polymorphism modulates opioid effects on analgesia and addiction but not on pupil size. Pharmacogenet Genomics, 20: 291-297.

161. Levran O, Peles E, Hamon S, Randesi M, Zhao C, Zhang B, Adelson M, Kreek MJ. (2012) Nerve growth factor beta polypeptide (NGFB) genetic variability: association with the methadone dose required for effective maintenance treatment. Pharmacogenomics J, 12: 319-327.

162. Bezchlibnyk YB, Wang JF, McQueen GM, Young LT. (2001) Gene expression differences in bipolar disorder revealed by cDNA array analysis of post-mortem frontal cortex. J Neurochem, 79: 826-834.

163. Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Fienberg AA. (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A, 98: 4746-4751.

164. Middleton FA, Mirnics K, Pierri JN, Lewis DA, Levitt P. (2002) Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. J Neurosci, 22: 2718-2729.

165. Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. Neuron, 28: 53-67.

166. Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. (2004)

Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. Mol Psychiatry, 9: 684-697, 643.

167. Vawter MP, Crook JM, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR, Becker KG, Freed WJ. (2002) Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. Schizophr Res, 58: 11-20.

168. Mehta D, Menke A, Binder EB. (2010) Gene expression studies in major depression. Curr Psychiatry Rep, 12: 135-144.

169. Aston C, Jiang L, Sokolov BP. (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. Mol Psychiatry, 10: 309-322.

170. Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, Myers RM, Bunney WE, Jr., Akil H, Watson SJ, Jones EG. (2005) Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 15653-15658.

171. Kang HJ, Adams DH, Simen A, Simen BB, Rajkowska G, Stockmeier CA, Overholser JC, Meltzer HY, Jurjus GJ, Konick LC, Newton SS, Duman RS. (2007) Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. J Neurosci, 27: 13329-13340.

172. Sibille E, Wang Y, Joeyen-Waldorf J, Gaiteri C, Surget A, Oh S, Belzung C, Tseng GC, Lewis DA. (2009) A molecular signature of depression in the amygdala. Am J Psychiatry, 166: 1011-1024.

173. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Sasaki T, Kato N, Kato T. (2008) Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. Neurosci Res, 60: 184-191.

174. Iwamoto K, Bundo M, Kato T. (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. Hum Mol Genet, 14: 241-253.

175. Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH, Bahn S. (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. Lancet, 362: 798-805.

176. Benes FM, Matzilevich D, Burke RE, Walsh J. (2006) The expression of proapoptosis genes is increased in bipolar disorder, but not in schizophrenia. Mol Psychiatry, 11: 241-251.

177. Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Ikeda K, Kato T. (2004) Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. Mol Psychiatry, 9: 406-416.

178. Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. (2004) Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. Arch Gen Psychiatry, 61: 300-308.

179. Nakatani N, Hattori E, Ohnishi T, Dean B, Iwayama Y, Matsumoto I, Kato T, Osumi N, Higuchi T, Niwa S, Yoshikawa T. (2006) Genome-wide expression analysis detects eight genes with robust alterations specific to bipolar I disorder: relevance to neuronal network perturbation. Hum Mol Genet, 15: 1949-1962.

180. Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. (2006) Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. J Psychiatry Neurosci, 31: 189-196.

181. Mahadik SP, Mukherjee S. (1996) Cultured skin fibroblasts as a cell model for investigating schizophrenia. J Psychiatr Res, 30: 421-439.

182. Miyamae Y, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. (1998) Altered adhesion efficiency and fibronectin content in fibroblasts from schizophrenic patients. Psychiatry Clin Neurosci, 52: 345-352.

183. Manier DH, Shelton RC, Ellis TC, Peterson CS, Eiring A, Sulser F. (2000) Human fibroblasts as a relevant model to study signal transduction in affective disorders. J Affect Disord, 61: 51-58.

184. Shelton RC, Mainer DH, Sulser F. (1996) cAMP-dependent protein kinase activity in major depression. Am J Psychiatry, 153: 1037-1042.

185. Horvath S, Janka Z, Mirnics K. (2010) Analyzing schizophrenia by DNA microarrays. Biol Psychiatry, 69: 157-162.

186. Mirnics K, Lewis DA. (2001) Genes and subtypes of schizophrenia. Trends Mol Med, 7: 281-283.

187. Garbett KA, Horvath S, Ebert PJ, Schmidt MJ, Lwin K, Mitchell A, Levitt P, Mirnics K. (2010) Novel animal models for studying complex brain disorders:

BAC-driven miRNA-mediated in vivo silencing of gene expression. Mol Psychiatry, 15: 987-995.

188. Garbett KA, Hsiao EY, Kalman S, Patterson PH, Mirnics K. (2012) Effects of maternal immune activation on gene expression patterns in the fetal brain. Transl Psychiatry, 2: e98.

189. Akin D, Manier DH, Sanders-Bush E, Shelton RC. (2005) Signal transduction abnormalities in melancholic depression. Int J Neuropsychopharmacol, 8: 5-16.

190. Gibson SA, Korade Z, Shelton RC. (2012) Oxidative stress and glutathione response in tissue cultures from persons with major depression. J Psychiatr Res, 46: 1326-1332.

191. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. (2007) Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. Toxicol Sci, 97: 539-547.

192. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med, 91: 14S-22S.

193. Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. (2003) UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. J Biol Chem, 278: 22432-22436.

194. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, Chung JH. (2009) Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. J Investig Dermatol Symp Proc, 14: 15-19.

195. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. Eur J Biochem, 267: 4912-4916.

196. Gawryluk JW, Wang JF, Andreazza AC, Shao L, Young LT. (2011) Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. Int J Neuropsychopharmacol, 14: 123-130.

197. Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M, Scuto M, Rizza S, Zanoli L, Neri S, Castellino P. (2012) Oxidative stress,

glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. Biochim Biophys Acta, 1822: 729-736.

198. del Hoyo P, Garcia-Redondo A, de Bustos F, Molina JA, Sayed Y, Alonso-Navarro H, Caballero L, Arenas J, Jimenez-Jimenez FJ. (2006) Oxidative stress in skin fibroblasts cultures of patients with Huntington's disease. Neurochem Res, 31: 1103-1109.
199. Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, Deppen P, Preisig M, Ruiz V, Steullet P, Tosic M, Werge T, Cuenod M, Do KQ. (2007) Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. Proc Natl Acad Sci U S A, 104: 16621-16626.
200. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. J Affect Disord, 111: 135-144.
201. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. Int J Neuropsychopharmacol, 11: 851-876.
202. Jacobs RA, Sly WS, Majerus PW. (1973) The regulation of fatty acid biosynthesis in human skin fibroblasts. J Biol Chem, 248: 1268-1276.
203. Raff RA. (1970) Induction of fatty acid synthesis in cultured mammalian cells: effects of cycloheximide and X-rays. J Cell Physiol, 75: 341-351.
204. Bensaude I, Callahan J, Philippart M. (1971) Fabry's disease as an -galactosidosis: evidence for an -configuration in trihexosyl ceramide. Biochem Biophys Res Commun, 43: 913-918.
205. Malan-Muller S, Hemmings SM, Seedat S. (2012) Big effects of small RNAs: a review of microRNAs in anxiety. Mol Neurobiol, 47: 726-739.
206. Leung AK, Sharp PA. (2007) microRNAs: a safeguard against turmoil? Cell, 130: 581-585.
207. Inui M, Martello G, Piccolo S. (2010) MicroRNA control of signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol, 11: 252-263.
208. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res, 19: 92-105.

209. Tsang JS, Ebert MS, van Oudenaarden A. (2010) Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures. Mol Cell, 38: 140-153.

210. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131: 861-872.

211. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318: 1917-1920.

212. Kim JE, O'Sullivan ML, Sanchez CA, Hwang M, Israel MA, Brennand K, Deerinck TJ, Goldstein LS, Gage FH, Ellisman MH, Ghosh A. (2011) Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 3005-3010.

213. Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell, 143: 527-539.

214. Manier DH, Eiring A, Shelton RC, Sulser F. (1996) Beta-adrenoceptor-linked protein kinase A (PKA) activity in human fibroblasts from normal subjects and from patients with major depression. Neuropsychopharmacology, 15: 555-561.

215. Akin D, Manier DH, Sanders-Bush E, Shelton RC. (2004) Decreased serotonin 5-HT2A receptor-stimulated phosphoinositide signaling in fibroblasts from melancholic depressed patients. Neuropsychopharmacology, 29: 2081-2087.

216. Ronai Z, Barta C, Guttman A, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. (2001) Genotyping the -521C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene. Electrophoresis, 22: 1102-1105.

217. Seaman MI, Fisher JB, Chang F, Kidd KK. (1999) Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). Am J Med Genet, 88: 705-709.

218. Ronai Z, Guttman A, Nemoda Z, Staub M, Kalasz H, Sasvari-Szekely M. (2000) Rapid and sensitive genotyping of dopamine D4 receptor tandem repeats by automated ultrathin-layer gel electrophoresis. Electrophoresis, 21: 2058-2061.

219. Castiglione CM, Deinard AS, Speed WC, Sirugo G, Rosenbaum HC, Zhang Y, Grandy DK, Grigorenko EL, Bonne-Tamir B, Pakstis AJ, et al. (1995) Evolution of haplotypes at the DRD2 locus. Am J Hum Genet, 57: 1445-1456.

220. Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. (1993) PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. Hum Mol Genet, 2: 2197.

221. Kidd KK, Pakstis AJ, Castiglione CM, Kidd JR, Speed WC, Goldman D, Knowler WC, Lu RB, Bonne-Tamir B. (1996) DRD2 haplotypes containing the TaqI A1 allele: implications for alcoholism research. Alcohol Clin Exp Res, 20: 697-705.

222. Szantai E, Kiraly O, Nemoda Z, Kereszturi E, Csapo Z, Sasvari-Szekely M, Gervai J, Ronai Z. (2005) Linkage analysis and molecular haplotyping of the dopamine D4 receptor gene promoter region. Psychiatr Genet, 15: 259-270.

223. Tarnok Z, Ronai Z, Gervai J, Kereszturi E, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2007) Dopaminergic candidate genes in Tourette syndrome: association between tic severity and 3' UTR polymorphism of the dopamine transporter gene. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 144B: 900-905.

224. Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. Genomics, 14: 1104-1106.

225. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics, 21: 263-265.

226. Dudbridge F. (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. Hum Hered, 66: 87-98.

227. Kohavi R, John GH. (1997) Wrappers for feature subset selection. Artificial Intelligence, 97: 273-324.

228. Pearl J. (2000) Causality: Models, Reasoning, and Inference. Cambridge: Cambridge University Press.

229. Antal P, Millinghoffer A, Hullam G, Szalai C, Falus A. (2008) A Bayesian View of Challenges in Feature Selection: Multilevel Analysis, Feature Aggregation, Multiple Targets, Redundancy and Interaction. JMLR: Workshop and Conference Procee: 74-89

230. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set

enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 15545-15550.

231. 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.

232. Stallings MC, Corley RP, Hewitt JK, Krauter KS, Lessem JM, Mikulich SK, Rhee SH, Smolen A, Young SE, Crowley TJ. (2003) A genome-wide search for quantitative trait loci influencing substance dependence vulnerability in adolescence. Drug Alcohol Depend, 70: 295-307.

233. Kotler M, Cohen H, Segman R, Gritsenko I, Nemanov L, Lerer B, Kramer I, Zer-Zion M, Kletz I, Ebstein RP. (1997) Excess dopamine D4 receptor (D4DR) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. Mol Psychiatry, 2: 251-254.

234. Chien CC, Lin CH, Chang YY, Lung FW. (2010) Association of VNTR polymorphisms in the MAOA promoter and DRD4 exon 3 with heroin dependence in male Chinese addicts. World J Biol Psychiatry, 11: 409-416.

235. Lusher JM, Chandler C, Ball D. (2001) Dopamine D4 receptor gene (DRD4) is associated with Novelty Seeking (NS) and substance abuse: the saga continues. Mol Psychiatry, 6: 497-499.

236. Franke P, Nothen MM, Wang T, Knapp M, Lichtermann D, Neidt H, Sander T, Propping P, Maier W. (2000) DRD4 exon III VNTR polymorphism-susceptibility factor for heroin dependence? Results of a case-control and a family-based association approach. Mol Psychiatry, 5: 101-104.

237. Gelernter J, Kranzler H, Coccaro E, Siever L, New A, Mulgrew CL. (1997) D4 dopamine-receptor (DRD4) alleles and novelty seeking in substance-dependent, personality-disorder, and control subjects. Am J Hum Genet, 61: 1144-1152.

238. Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A, Sasvari-Szekely M. (2004) 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 B Neuropsychiatr Genet, 126B: 74-78.

239. Li T, Zhu ZH, Liu X, Hu X, Zhao J, Sham PC, Collier DA. (2000) Association analysis of polymorphisms in the DRD4 gene and heroin abuse in Chinese subjects. Am J Med Genet, 96: 616-621.

240. Lai JH, Zhu YS, Huo ZH, Sun RF, Yu B, Wang YP, Chai ZQ, Li SB. (2010) Association study of polymorphisms in the promoter region of DRD4 with schizophrenia, depression, and heroin addiction. Brain Res, 1359: 227-232.

241. Szilagyi A, Boor K, Szekely A, Gaszner P, Kalasz H, Sasvari-Szekely M, Barta C. (2005) Combined effect of promoter polymorphisms in the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter genes in heroin dependence. Neuropsychopharmacol Hung, 7: 28-33.

242. Kotyuk E, Kovacs-Nagy R, Faludi G, Urban R, Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Szekely A. (2009) [Association between nicotine dependence and the -521 promoter polymorphism of the dopamine D4 receptor in patients with major depression]. Neuropsychopharmacol Hung, 11: 59-67.

243. Ho AM, Tang NL, Cheung BK, Stadlin A. (2008) Dopamine receptor D4 gene -521C/T polymorphism is associated with opioid dependence through cold-pain responses. Ann N Y Acad Sci, 1139: 20-26.

244. Okuyama Y, Ishiguro H, Nankai M, Shibuya H, Watanabe A, Arinami T. (2000) Identification of a polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with the human novelty seeking personality trait. Mol Psychiatry, 5: 64-69.

245. Ronai Z, Szekely A, Nemoda Z, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. (2001) Association between Novelty Seeking and the -521 C/T polymorphism in the promoter region of the DRD4 gene. Mol Psychiatry, 6: 35-38.

246. Schinka JA, Letsch EA, Crawford FC. (2002) DRD4 and novelty seeking: results of meta-analyses. Am J Med Genet, 114: 643-648.

247. Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M, Arinami T. (1999) A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia. Biochem Biophys Res Commun, 258: 292-295.

248. Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2007) 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, 144B: 231-236.

249. Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z. (2006) No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. BMC Mol Biol, 7: 18.

250. Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. Nat Genet, 12: 81-84.

251. Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH. (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. Nat Genet, 12: 78-80.

252. Laucht M, Becker K, Blomeyer D, Schmidt MH. (2007) Novelty seeking involved in mediating the association between the dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism and heavy drinking in male adolescents: results from a high-risk community sample. Biol Psychiatry, 61: 87-92.

253. Laucht M, Becker K, El-Faddagh M, Hohm E, Schmidt MH. (2005) Association of the DRD4 exon III polymorphism with smoking in fifteen-year-olds: a mediating role for novelty seeking? J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 44: 477-484.

254. Kluger AN, Siegfried Z, Ebstein RP. (2002) A meta-analysis of the association between DRD4 polymorphism and novelty seeking. Mol Psychiatry, 7: 712-717.

255. Etter JF, Pelissolo A, Pomerleau C, De Saint-Hilaire Z. (2003) Associations between smoking and heritable temperament traits. Nicotine Tob Res, 5: 401-409.

256. Gabel S, Stallings MC, Schmitz S, Young SE, Fulker DW. (1999) Personality dimensions and substance misuse: relationships in adolescents, mothers and fathers. Am J Addict, 8: 101-113.

257. Rose RJ. (1998) A developmental behavior-genetic perspective on alcoholism risk. Alcohol Health Res World, 22: 131-143.

258. Hutchison KE, McGeary J, Smolen A, Bryan A, Swift RM. (2002) The DRD4 VNTR polymorphism moderates craving after alcohol consumption. Health Psychol, 21: 139-146.

259. Shao C, Li Y, Jiang K, Zhang D, Xu Y, Lin L, Wang Q, Zhao M, Jin L. (2006) Dopamine D4 receptor polymorphism modulates cue-elicited heroin craving in Chinese. Psychopharmacology (Berl), 186: 185-190.

260. Sobik L, Hutchison K, Craighead L. (2005) Cue-elicited craving for food: a fresh approach to the study of binge eating. Appetite, 44: 253-261.

261. McGeary J. (2009) The DRD4 exon 3 VNTR polymorphism and addiction-related phenotypes: a review. Pharmacol Biochem Behav, 93: 222-229.

262. Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. (2001) 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet, 105: 84-90.

263. Camara E, Kramer UM, Cunillera T, Marco-Pallares J, Cucurell D, Nager W, Mestres-Misse A, Bauer P, Schule R, Schols L, Tempelmann C, Rodriguez-Fornells A, Munte TF. (2010) The effects of COMT (Val108/158Met) and DRD4 (SNP -521) dopamine genotypes on brain activations related to valence and magnitude of rewards. Cereb Cortex, 20: 1985-1996.

264. Smith L, Watson M, Gates S, Ball D, Foxcroft D. (2008) Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: a HuGE gene-disease association review. Am J Epidemiol, 167: 125-138.

265. Le Foll B, Gallo A, Le Strat Y, Lu L, Gorwood P. (2009) Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. Behav Pharmacol, 20: 1-17.

266. Munafo MR, Timpson NJ, David SP, Ebrahim S, Lawlor DA. (2009) Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and smoking behavior: a meta-analysis and new data. Nicotine Tob Res, 11: 64-76.

267. Yang BZ, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X, Gelernter J. (2007) Association of haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 to alcohol dependence in independent case control and family samples. Hum Mol Genet, 16: 2844-2853.

268. Kraschewski A, Reese J, Anghelescu I, Winterer G, Schmidt LG, Gallinat J, Finckh U, Rommelspacher H, Wernicke C. (2009) Association of the dopamine D2 receptor gene with alcohol dependence: haplotypes and subgroups of alcoholics as key factors for understanding receptor function. Pharmacogenet Genomics, 19: 513-527.

269. Xu K, Lichtermann D, Lipsky RH, Franke P, Liu X, Hu Y, Cao L, Schwab SG, Wildenauer DB, Bau CH, Ferro E, Astor W, Finch T, Terry J, Taubman J, Maier

W, Goldman D. (2004) Association of specific haplotypes of D2 dopamine receptor gene with vulnerability to heroin dependence in 2 distinct populations. Arch Gen Psychiatry, 61: 597-606.

270. Perez de los Cobos J, Baiget M, Trujols J, Sinol N, Volpini V, Banuls E, Calafell F, Luquero E, del Rio E, Alvarez E. (2007) Allelic and genotypic associations of DRD2 TaqI A polymorphism with heroin dependence in Spanish subjects: a case control study. Behav Brain Funct, 3: 25.

271. Young RM, Lawford BR, Nutting A, Noble EP. (2004) Advances in molecular genetics and the prevention and treatment of substance misuse: Implications of association studies of the A1 allele of the D2 dopamine receptor gene. Addict Behav, 29: 1275-1294.

272. Spitz MR, Shi H, Yang F, Hudmon KS, Jiang H, Chamberlain RM, Amos CI, Wan Y, Cinciripini P, Hong WK, Wu X. (1998) Case-control study of the D2 dopamine receptor gene and smoking status in lung cancer patients. J Natl Cancer Inst, 90: 358-363.

273. Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, Fitch RJ, Ozkaragoz T, Sheridan PJ, Anglin MD, et al. (1993) Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. Drug Alcohol Depend, 33: 271-285.

274. Persico AM, Bird G, Gabbay FH, Uhl GR. (1996) D2 dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers. Biol Psychiatry, 40: 776-784.

275. Glatt SJ, Jonsson EG. (2006) The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 141B: 149-154.

276. Hosak L. (2007) Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review. Eur Psychiatry, 22: 276-281.

277. Strous RD, Nolan KA, Lapidus R, Diaz L, Saito T, Lachman HM. (2003) Aggressive behavior in schizophrenia is associated with the low enzyme activity

COMT polymorphism: a replication study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 120B: 29-34.

278. Kotler M, Barak P, Cohen H, Averbuch IE, Grinshpoon A, Gritsenko I, Nemanov L, Ebstein RP. (1999) Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol O-methyltransferase (COMT) activity. Am J Med Genet, 88: 628-633.

279. Vandenbergh DJ, Rodriguez LA, Miller IT, Uhl GR, Lachman HM. (1997) High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers. Am J Med Genet, 74: 439-442.

280. Li T, Chen CK, Hu X, Ball D, Lin SK, Chen W, Sham PC, Loh el W, Murray RM, Collier DA. (2004) Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 129B: 120-124.

281. Horowitz R, Kotler M, Shufman E, Aharoni S, Kremer I, Cohen H, Ebstein RP. (2000) Confirmation of an excess of the high enzyme activity COMT val allele in heroin addicts in a family-based haplotype relative risk study. Am J Med Genet, 96: 599-603.

282. Oosterhuis BE, LaForge KS, Proudnikov D, Ho A, Nielsen DA, Gianotti R, Barral S, Gordon D, Leal SM, Ott J, Kreek MJ. (2008) Catechol-O-methyltransferase (COMT) gene variants: possible association of the Val158Met variant with opiate addiction in Hispanic women. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 147B: 793-798.

283. Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Pettinati HM, Oslin DW, Dackis CA, O'Brien CP, Berrettini WH. (2008) Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. Neuropsychopharmacology, 33: 3078-3084.

284. West A, Langley K, Hamshere ML, Kent L, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan M, Thapar A. (2002) Evidence to suggest biased phenotypes in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder from completely ascertained trios. Mol Psychiatry, 7: 962-966.

285. Comings DE, Ferry L, Bradshaw-Robinson S, Burchette R, Chiu C, Muhleman D. (1996) The dopamine D2 receptor (DRD2) gene: a genetic risk factor in smoking. Pharmacogenetics, 6: 73-79.

286. Noble EP, St Jeor ST, Ritchie T, Syndulko K, St Jeor SC, Fitch RJ, Brunner RL, Sparkes RS. (1994) D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? Med Hypotheses, 42: 257-260.

287. Crettol S, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, Gothuey I, Monnat M, Deglon JJ, Preisig M, Eap CB. (2008) Association of dopamine and opioid receptor genetic polymorphisms with response to methadone maintenance treatment. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 32: 1722-1727.

288. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV. (2003) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. Hum Mol Genet, 12: 205-216.

289. Garrido E, Palomo T, Ponce G, Garcia-Consuegra I, Jimenez-Arriero MA, Hoenicka J. (2011) The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. Neurotox Res, 20: 32-39.

290. Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Chan WC, Lin WC. (2011) Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. Int J Cancer, 129: 2600-2610.

291. Cao J, Shen Y, Zhu L, Xu Y, Zhou Y, Wu Z, Li Y, Yan X, Zhu X. (2012) miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. Nat Cell Biol, 14: 697-706.

292. Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Jaworski C, Duncan T, Cameron JE, Flemington EK, Hooks JJ, Redmond TM. (2013) Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma. Mol Vis, 19: 737-750.

293. Takahashi N, Nakaoka T, Yamashita N. (2012) Profiling of immune-related microRNA expression in human cord blood and adult peripheral blood cells upon proinflammatory stimulation. Eur J Haematol, 88: 31-38.

294. Hulsmans M, Van Dooren E, Mathieu C, Holvoet P. (2012) Decrease of miR-146b-5p in monocytes during obesity is associated with loss of the anti-inflammatory but not insulin signaling action of adiponectin. PLoS One, 7: e32794.

295. Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. (2011) MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF-beta by repressing SMAD4 in thyroid cancer. Oncogene, 31: 1910-1922.

296. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, Lidereau R, Mikaelian I, Mazoyer S. (2011) Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. EMBO Mol Med, 3: 279-290.

297. Katakowski M, Zheng X, Jiang F, Rogers T, Szalad A, Chopp M. (2010) MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma. Cancer Invest, 28: 1024-1030.

298. Michel M, Schmidt MJ, Mirnics K. (2012) Immune system gene dysregulation in autism and schizophrenia. Dev Neurobiol, 72: 1277-1287.

299. Naydenov AV, MacDonald ML, Ongur D, Konradi C. (2007) Differences in lymphocyte electron transport gene expression levels between subjects with bipolar disorder and normal controls in response to glucose deprivation stress. Arch Gen Psychiatry, 64: 555-564.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

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.

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

Dr. Mandl Józsefnek a Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola és a Patobiokémia Doktori Program vezetőjének, aki mint az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet korábbi igazgatója lehetővé tette számomra, hogy a doktori képzés keretein belül az intézetében végezhettem kutatómunkámat;

Dr. Bánhegyi Gábornak, az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet jelenlegi igazgatójának, amiért az általa vezetett intézetben helyet biztosított a számomra;

Dr. Sasvári Máriának, laborunk korábbi vezetőjének, akinek irányítása alatt kezdtem el mind TDK, mind pedig PhD munkámat és aki mindvégig segítségemre volt, tanácsaival, ötleteivel nagymértékben elősegítette az előrehaladásomat;

Dr. Rónai Zsoltnak, laborunk jelenlegi vezetőjének, aki rengeteg segítséget nyújtott mind szakmai, mind emberi téren;

Dr. Barta Csaba témavezetőmnek, akivel TDK munkám megkezdése óta jó hangulatban dolgozhattam együtt, és akinek szakmai tudása, javaslatai mindig sokat segítettek munkám előrehaladásában;

valamint a labor minden korábbi és jelenlegi dolgozójának, akik segítették munkámat, ösztönöztek és bátorítottak, kedvességükkel, barátságukkal vagy akár egy jó szóval hozzájárultak a labor barátságos légköréhez;

kollaboráló munkatársainknak, Antal Péternek és Sárközy Péternek a BME Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékéről, akik bevezettek minket a bioinformatika és a Bayes-i statisztika rejtelmeibe, Dr. Székely Annának a statisztikai elemzésben nyújtott segítségéért, Dr. Demetrovics Zsoltnak az asszociáció-vizsgálatokban résztvevők klinikai jellemzéséért, továbbá Szilágyi Ágnesnek a III. számú Belgyógyászati Klinikáról és természetesen

a vizsgálatokban részt vevő személyeknek és a minták összegyűjtésében közreműködőknek.

Továbbá köszönöm Dr. Mirnics Károlynak és a Vanderbilt University-nek a lehetőséget, hogy Nashville-ben tölthettem egy évet és részt vehettem az ott folyó kutatásokban, köszönöm Zeljka Korade, Krassimira Garbett, Martin J. Schmidt, Amanda C. Mitchell és Mona Everheart segítségét, barátságát, hogy mindenben a segítségemre voltak és hogy egy csodás évet tanulhattam és kutathattam a munkacsoportjukban.

Végezetül köszönet Családomnak és Barátaimnak szakadatlan türelmükért és támogatásukért.