

## Brak asocjacji pomiędzy polimorfizmem -141C Ins/Del w odcinku promotorowym genu DRD2 a schizofrenią\*

### Lack of association between -141C Ins/Del promoter polymorphism of DRD2 gene and schizophrenia

Paweł K a p e l s k i<sup>1</sup>, Piotr M. C z e r s k i<sup>2</sup>, Sebastian G o d l e w s k i<sup>1</sup>,  
Monika D m i t r z a k-W ę g l a r z<sup>2</sup>, Joanna H a u s e r<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Z Kliniki Psychiatrii Dorosłych AM w Poznaniu  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J.K. Rybakowski

<sup>2</sup>Z Pracowni Genetyki Psychiatrycznej Katedry Psychiatrii AM w Poznaniu  
Kierownik: dr hab. n. med. J. Hauser

#### Summary

Results of family studies show the importance of genetic factors in etiopathogenesis of schizophrenia. Susceptibility to the disease is probably due to an interaction of many genes. This association study was conducted to investigate frequencies of alleles and genotypes in a group of patients with schizophrenia and in healthy controls. We examined DRD2 gene promoter polymorphism - insertion or deletion of the cytosine in the position -141 of 5'-flanking region of this gene. No relationship between the polymorphism under study and schizophrenia has been found.

*Słowa klucze:* schizofrenia, genetyka, DRD2

*Key words:* schizophrenia, genetics, DRD2

#### Wstęp

Badania sposobów dziedziczenia schizofrenii wykluczają istnienie pojedynczego genu determinującego chorobę. Najbardziej prawdopodobny wydaje się złożony model dziedziczenia schorzenia polegający na łącznym działaniu wielu (kilkunastu lub kilkudziesięciu) genów [1].

W patogenezie schizofrenii kluczową rolę przypisuje się zwiększonemu przekąźnictwu dopaminergicznemu w OUN [2]. Liczne badania farmakologiczne wykazały, że pobudzenie ośrodkowych receptorów dopaminowych u ludzi wywołuje psychozy schizofrenopodobne, a u zwierząt stereotypię. Za znaczeniem receptorów dopaminowych w patogenezie schizofrenii przemawia również skuteczność kliniczna neuroleptyków działających na receptory dopaminowe [3]. W badaniach post mortem

---

\*Praca finansowana przez KBN – projekt badawczy KBN 4PO5B 093 16 „Badania »genów kandydatów« u chorych na schizofrenię z uwzględnieniem markera neurofizjologicznego (ruchy gałek

wykazano większą gęstość receptorów dopaminowych D2 w mózgach schizofreników niż osób zdrowych [4].

U ludzi receptor D2 występuje w całym mózgu. Należy on do klasy glikoprotein i jest sprzężony funkcjonalnie z systemem białek G. Istnieją 2 warianty tego receptora: forma długa (D2L), zbudowana z 443 aminokwasów, oraz występująca rzadziej forma krótka (D2S), składająca się z 414 aminokwasów. Obie formy kodowane są przez ten sam gen.

Gen kodujący receptor D2 (gen DRD2) położony jest w regionie q22-23 chromosomu 11. Ma on nieciągłą strukturę – składa się z 8 eksonów i 7 intronów, a jego cDNA ma wielkość 2499 par zasad [5, 6].

Badany polimorfizm charakteryzuje się obecnością insercji lub delecji cytozyny w 5' – końcowym, promotorowym odcinku genu DRD2 (-141C Ins/Del). Delecja cytozyny w opisanym miejscu powoduje zanik miejsca restrykcyjnego rozpoznawanego przez enzym BstNI [6]. Wykazano, że obecność allelu -141C Del wiąże się z obniżeniem o 20 do 40% ekspresji genu w hodowlach komórkowych [7], a także z większą gęstością receptorów D2 w prądkowiu [8]. Kilku autorów stwierdziło, że powyższa delecja występuje rzadziej u pacjentów chorych na schizofrenię niż w grupie kontrolnej [7, 9], natomiast Breen, w badaniach populacji brytyjskiej, wykazał asocjację allelu -141C Del ze schizofrenią [za: 6]. Inni autorzy nie stwierdzili związku pomiędzy powyższym polimorfizmem a schizofrenią [10, 11].

W obrębie genu kodującego receptor D2 zidentyfikowano, poza powyższym, jeszcze wiele innych polimorfizmów – jak do tej pory jednak tylko w przypadku kilku z nich postulowano związek ze schizofrenią. Są to polimorfizmy: Ser311Cys, w przypadku którego wariant Cys311 występuje częściej u ludzi chorych na schizofrenię niż zdrowych [12], oraz polimorfizm TaqI A1/A2 i TaqI B1/B2, w którym obecność allelu A2 i B2, a w szczególności obu ich łącznie, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia schizofrenii [13].

## **Material i metoda**

### **Osoby badane**

W badaniu wzięło udział 219 nie spokrewnionych pacjentów z rozpoznaniem schizofrenii paranoidalnej (135 mężczyzn i 84 kobiety), średnia wieku – 30,86 lat (SD=10,01), spełniających kryteria diagnostyczne DSM-IV [14]. Pacjenci byli rekrutowani z Kliniki Psychiatrii Dorosłych AM w Poznaniu (164 osoby), z Kliniki Psychiatrii AM w Bydgoszczy (26 osób) oraz ze szpitala psychiatrycznego w Gnieźnie (29 osób). Stan psychiczny chorych oceniany był przez 2 lekarzy psychiatrów z Kliniki Psychiatrii Dorosłych AM w Poznaniu na podstawie ustrukturalizowanego wywiadu [15] dotyczącego zaburzeń I osi DSM-IV. Grupa kontrolna liczyła 173 osoby (101 mężczyzn i 72 kobiety) – zdrowe, nie leczone psychiatrycznie, średnia wieku – 39,78 lat (SD=11,32). W jej skład weszli dawcy krwi, studenci medycyny oraz personel szpitalny. Osoby z grupy kontrolnej nie były spokrewnione z pacjentami. Pacjenci oraz osoby z grupy kontrolnej udzielili pisemnej zgody na pobranie krwi do badań genetycznych. Projekt uzyskał akceptację terenowej komisji etycznej w Poznaniu. Wszystkie osoby biorące udział w badaniu pochodziły z populacji polskiej, w większości z terenu Wielkopolski.

### Analiza DNA

Genomowy DNA został wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej metodą wysalania [16]. Do analizy polimorfizmu -141C Ins/Del genu DRD2 zastosowano technikę PCR-RFLP. Amplifikacji poddano rejon promotora genu DRD2, używając starterów opisanych przez Arinamiego i wsp. [7]. Uzyskano produkt PCR o długości 304 par zasad. Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 25  $\mu$ l, która zawierała: 0,3–0,6  $\mu$ g genomowego DNA, 0,5  $\mu$ M starterów, 0,2 mM dNTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08% NP40, 0,5 U polimerazy Taq (MBI Fermentas). Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 2 min. w 95°C; 30 cykli obejmujących: 30 s w 94°C, 30 s w 64°C, 30 s w 72°C; końcowa elongacja – 5 min w 72°C. Produkt reakcji PCR w ilości 5  $\mu$ l poddano całościowej analizie restrykcyjnej w temp. 37°C, w całkowitej objętości mieszaniny 10  $\mu$ l, używając 0,25U enzymu MvaI (MBI Fermentas) – izoschimeru enzymu BstNI. Produkt PCR poddany analizie restrykcyjnej rozdzielono w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Na podstawie wyników rozdziału określono genotypy. W przypadku braku polimorficznego miejsca restrykcyjnego dla MvaI stwierdza się obecność fragmentu o długości 304 par zasad (allel -141C Ins); w obecności polimorficznego miejsca restrykcyjnego powstają 2 fragmenty – o długościach 160 par zasad i 144 par zasad (allel-141C Del).

### Wyniki

Analizowano liczebność poszczególnych genotypów oraz alleli DRD2 określonych na podstawie polimorfizmu -141C Ins/Del, polegającego na występowaniu 2 alleli różniących się obecnością cytozyny w pozycji -141. Analizę wykonano w grupie pacjentów ze schizofrenią oraz w grupie kontrolnej, a także w podgrupach uwzględniających podział na płeć.

Tabela 1

Częstość występowania w grupie chorych na schizofrenię i w grupie kontrolnej genotypów DRD2 (w nawiasie w procentach)

| Grupa                | n   | Ins/Ins    | Ins/Del   | Del/Del | p     |
|----------------------|-----|------------|-----------|---------|-------|
| Pacjenci             | 210 | 100 (77,2) | 50 (22,8) | 0 (0)   | 0,230 |
| Kontrola             | 173 | 130 (78,0) | 35 (20,2) | 2 (1,2) |       |
|                      |     |            |           |         |       |
| Mężczyźni – pacjenci | 135 | 98 (72,0)  | 37 (27,4) | 0 (0)   | 0,280 |
| Mężczyźni – kontrola | 101 | 80 (79,2)  | 21 (20,8) | 0 (0)   |       |
|                      |     |            |           |         |       |
| Kobiety – pacjenci   | 84  | 71 (84,5)  | 13 (15,5) | 0 (0)   | 0,234 |
| Kobiety – kontrola   | 72  | 50 (77,8)  | 14 (19,4) | 2 (2,8) |       |

Jak wynika z tabeli 1, częstość występowania genotypów Ins/Ins, Ins/Del i Del/Del nie różniła się istotnie statystycznie w grupie schizofreników w porównaniu z grupą

kontrolną ( $\chi^2=2,859$ ;  $p=0,239$ ;  $df=2$ ). Również po podzieleniu pacjentów i osób zdrowych na podgrupy w zależności od płci nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic (u mężczyzn w obliczeniach zastosowano test dokładnego prawdopodobieństwa Fishera,  $p=0,286$ ; u kobiet test  $\chi^2: =2,903$ ;  $df=2$ ;  $p=0,234$ ).

Nie zaobserwowano również różnic istotnych statystycznie w częstości występowania alleli -141C Ins/Del DRD2 pomiędzy grupą chorych na schizofrenię a osobami zdrowymi ( $p=1,0000$ ) oraz w grupach wyszczególnionych wcześniej na podstawie płci (u mężczyzn  $p=0,322$ , a u kobiet  $p=0,186$ ).

Tabela 2

Częstość występowania w grupie chorych na schizofrenię i w grupie kontrolnej alleli DRD2

| Grupa                | n   | Allel Ins | Allel Del | p     |
|----------------------|-----|-----------|-----------|-------|
| Pacjenci             | 219 | 0,39      | 0,11      | 1     |
| Kontrola             | 173 | 0,39      | 0,11      |       |
| Mężczyźni - pacjenci | 135 | 0,39      | 0,14      | 0,322 |
| Mężczyźni - kontrola | 101 | 0,40      | 0,10      |       |
| Kobiety - pacjenci   | 84  | 0,42      | 0,08      | 0,186 |
| Kobiety - kontrola   | 72  | 0,38      | 0,12      |       |

### Omówienie wyników

W niniejszej pracy analizowano związek pomiędzy polimorfizmem -141C Ins/Del genu DRD2 a schizofrenią. Badano częstość występowania alleli i genotypów powyższego polimorfizmu w grupie chorych ze schizofrenią oraz w grupie kontrolnej, a także w podgrupach uwzględniających podział na płeć. Nie stwierdzono asocjacji ani allelowych, ani genotypowych badanego polimorfizmu ze schizofrenią w grupie pacjentów i w wyszczególnionych podgrupach.

Wyniki dotychczasowych badań nad związkiem polimorfizmu -141C Ins/Del a schizofrenią są kontrowersyjne. Chorzy na schizofrenię są grupą heterogenną, różniącą się między sobą obrazem klinicznym choroby, odpowiedzią na leki, występowaniem po nich objawów ubocznych. Arinami, badając populację japońską, stwierdził, że allel -141C Del występuje rzadziej u pacjentów ze schizofrenią, co koreluje z doniesieniem [7], wskazującym na obniżoną ekspresję genu DRD2 w hodowlach komórkowych w przypadku tego allelu. Podobne wyniki uzyskał, w badaniach na populacji szwedzkiej, Jönsson i wsp. który stwierdził ponadto znacznie rzadsze występowanie allelu -141C Del u pacjentów, u których wystąpiły objawy pozapiramidowe, w porównaniu z pacjentami, którzy tych objawów nie mieli [9]. Być może wytłumaczeniem tego faktu jest większa gęstość receptorów dopaminowych D2 w prążkowiu u osób z allelem -141C Del, stwierdzona w badaniu zdrowych osobników [8].

Inni badacze nie stwierdzili związku pomiędzy omawianym polimorfizmem a schizofrenią [10, 11], natomiast Breen, w swoich badaniach populacji brytyjskiej, wykazał przeciwną asocjację (związek pomiędzy allelem -141C Del a schizofrenią [za: 7]. Niezgodność wyników można częściowo tłumaczyć znacznymi różnicami etnicznymi badanych populacji, a co za tym idzie – różną częstością występowania poszczególnych alleli. W populacji japońskiej delecja -141C jest częstsza (0,21–0,23) [8] niż wśród rasy kaukaskiej (0,10–0,12) [17]. Stosunkowo rzadkie występowanie powyższego allelu u rasy kaukaskiej stwarza problem małej liczebności grupy osób homozygotycznych pod względem tego allelu. W badanej przez nas grupie zaobserwowaliśmy tylko 2 osoby będące homozygotami Del/Del, i to wśród zdrowych, natomiast żaden z pacjentów nie miał powyższego genotypu, ze względu jednak na wspomniane rzadkie występowanie powyższego allelu oraz zbyt małą liczebność badanej grupy trudno wyciągać z tego faktu jakieś wnioski.

### Wnioski

W naszych badaniach nie stwierdziliśmy związku pomiędzy polimorfizmem -141C Ins/Del a schizofrenią. Ciekawe mogłoby być badanie polegające na wyselekcjonowaniu podgrup chorych w zależności od cech klinicznych (np. występowania u pacjentów objawów pozapiramidowych – jak zrobił to Jönsson) i próba ich korelacji z obecnością lub brakiem poszczególnych alleli. W naszej pracy nie podjęliśmy takiej próby ze względu na zbyt niską liczebność badanej grupy, a co za tym idzie brak istotności statystycznej w przypadku takiego badania.

Na podstawie innych badań można wnioskować, że liczne polimorfizmy w obrębie genu kodującego receptor D2 mogą tworzyć haplotypy, które w różnym stopniu zwiększają ryzyko zachorowania na schizofrenię. Brak asocjacji badanego polimorfizmu ze schizofrenią nie wyklucza istnienia takiego związku w przypadku innego polimorfizmu genu kodującego DRD2 – zwłaszcza iż opisano ich wiele. W wyjaśnieniu tych kwestii pomocne będą dalsze badania. Aby definitywnie wykluczyć udział badanego polimorfizmu genu DRD2 w predyspozycji do schizofrenii, potrzebna byłaby grupa o liczebności rzędu 1000 osób. Połączenie otrzymanego przez nas wyniku z wynikami z innych ośrodków pozwoliłoby na przeprowadzenie metaanalizy obejmującej tak dużą grupę badanych. Takie podejście – metaanaliza badań genu DRD3 obejmująca 5351 osób – przyniosło wiele cennych informacji i wykazało związek ze schizofrenią w przypadku homozygotycznych genotypów dla tego receptora [18].

### Źródła informacji o autorach i adresy korespondencyjne

#### Źródła informacji

Działalność naukowa i kliniczna autorów jest związana z Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Adresy korespondencyjne: dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl; dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl; dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl.

Źródła informacji o autorach i adresy korespondencyjne: dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl; dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl; dr hab. n. med. Andrzej Czamara, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Dłubnia 156, 01-645 Warszawa, e-mail: czamara@ipn.edu.pl.

čëč äłëłičč öčñiččír à 5'-çiił-iüë indłçel ýñiäi äłír. Íí ñëł-lüü ná'çč čñnéłäiäriiüiäi d'iečëidöčçëf ñ řčçödłičlé.

### Assoziationsmangel zwischen dem Polymorphismus 141C Ins/Del im Promotorsegment des Gens DRD2 und der Schizophrenie

#### Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen zeigten auf die Bedeutung der genetischen Faktoren in der ätiopathogenese der Schizophrenie. Die Anfälligkeit ist wahrscheinlich die Folge von Mitwirkung vieler Genen. Es wurden die assoziativen Forschungen zur Häufigkeit des Auftretens einzelner Allelen und Genotype in der Gruppe der an Schizophrenie kranken Personen und in der Kontrollgruppe durchgeführt. Es wurde der Polymorphismus des kandidierenden Gens DRD2 untersucht, der auf der Anwesenheit der Zitosininsertion oder -deletion in 5' Schlusssegment des obigen Gens beruht. Zwischen dem untersuchten Polymorphismus und der Schizophrenie wurde kein Zusammenhang festgestellt.

### Le manque d'association du polymorphisme promoteur -141C Ins/Del du gène DRD2 et la schizophrénie

#### Résumé

Les résultats des recherches familiales montrent l'importance des facteurs génétiques dans l'étiopathogénèse de schizophrénie. La susceptibilité à cette maladie résulte probablement de l'interaction de plusieurs gènes. On a fait des études d'association concernant la fréquence des allèles et génotypes particuliers des schizophrènes et du groupe de contrôle. On examine aussi le polymorphisme promoteur du gène DRD2 consistant à la présence de l'insertion ou de la délétion de la cytosine dans la 5-ième partie finale du gène en question. On ne constate pas de liaison du polymorphisme analyse avec la schizophrénie.

#### Piśmiennictwo

1. McGuffin P, Owen M.J, Farmer AE. *Genetic basis of schizophrenia*. Lancet 1995; 346: 678–682.
2. Asherson P, Mant R, McGuffin P. Rozdz.14. W: Hirsch SR, Weinberg DR, red. *Schizofrenia*. Cambridge (Great Britain) Blackwell Science Ltd ;1995, s. 253–274.
3. Wielgosz M. *Rola receptorów dopaminergicznych D-1 i D-2 w działaniu neuroleptyków i patogenezie schizofrenii*. Psychiatr. Pol. 1992; XXVI, 5: 357–364.
4. Wolfarth S, Ossowska K. *Farmakologia leków przeciwpsychotycznych*. W: Bijak M, Lasoń W, red. *Neuropsychofarmakologia dziś i jutro*. Kraków: Instytut Farmakologii PAN; 2000.
5. Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O. *The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP*. Am. J. Hum. Genet. 1989, 45(5): 778–785.
6. Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fisher JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, Civelli O. *Cloning of the cDNA and gene for a human D<sub>2</sub> dopamine receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 9762–9766.
7. Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M. *A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia*. Hum. Molecul. Gen. 1997; 6, 4: 577–582.
8. Jönsson EG, Nöthen MM, Grünhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall GC. *Polymor-*

- phisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers.* *Molecul. Psychiatry* 1999; 4: 290–296.
9. Jönsson EG, Nöthen MM, Neidt H, Forslund K, Rylander G, Mattila-Evenden M, Asberg M, Propping P, Sedvall GC. *Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia.* *Schizophr. Res.* 1999; 40: 31–36.
  10. Li T, Arranz M, Aitchison KJ, Bryant C, Liu X, Kerwin RW, Murray R, Sham P, Collier DA. *Case control, haplotype relative risk and transmission disequilibrium analysis of a dopamine D2 receptor functional promoter polymorphism in schizophrenia.* *Schizophr. Res.* 1998; 32: 87–92.
  11. Tallerico T, Ulpian C, Liu ISC. *Dopamine D2 receptor promoter polymorphism: no association with schizophrenia.* *Psychiatry Res.* 1999; 85: 215–219.
  12. Arinami T, Itokawa M, Enguchi H, Tagaya H, Yano S, Shimizu H, Hamaguchi H, Toru M. *Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia.* *Lancet* 1994; 343: 703–704.
  13. Dubertret C, Gorwood P, Gouya L, Deybach JC, Ades J. *Association and excess of transmission of a DRD2 haplotype in a sample of French schizophrenic patients.* *Schizophr. Res.* 2001; 49: 203–212.
  14. *American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition.* Washington, D.C.: American Psychiatric Association; 1994.
  15. First MB, Gibbon M, Spitzer R.L, Williams J. W: *User's guide for the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders - Research Version - (SCID-I, Version 2.0,* February 1996 FINAL Version).
  16. Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF, Ichinose H, Nagatsu T. *DRD2 allele frequencies and linkage disequilibria, including the -141C Ins/Del promoter polymorphism, in European-American, African-American, and Japanese subjects.* *Genom.* 1998; 51: 21–26.
  17. Miller SA, Dykes D, Plesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* *Nucl. Acids Res.* 1988; 16: 1215.
  18. Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L, Cardno A, Asherson P, Blackwood D, Muir W, Meszaros K, Aschauer H, Mallet J, Laurent C, Pekkarinen P, Seppala J, Stefanis CN, Papadimitriou GN, Macciardi F, Verga M, Pato C, Azevedo H, Crocq MA, Gurling H, Owen MJ i in. *A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia.* *Mol Psychiatry* 1998; 3(2): 141–149.

Otrzymano: 28.11.2001

Zrecenzowano: 8.02.2002

Przyjęto do druku: 7.03.2002

Adres: Paweł Kapelski  
Klinika Psychiatrii Dorosłych  
Akademii Medycznej w Poznaniu  
60-572 Poznań, ul. Szpitalna

