

PROJEKT ZÁRÓ BESZÁMOLÓ

A pályázati munkatervben a 4 éves futamidőre összesen 10 részfeladatot terveztünk, ezeket a feladatokat teljesítettük, és a kapott eredményeket nemzetközi folyóiratokban publikáltuk, illetve a legfrissebb eredményeket konferenciákon mutattuk be (publikációk folyamatban).

Eredményeink a következőkben foglalhatók össze (az alábbiakban a pályázat „Munkaterv” részében meghatározott 10 részfeladat eredeti számozását meghagytuk, de a feladatokat értelemszerűen összevontuk):

1. Biobank létrehozása pszichogenetikai vizsgálatok céljára (A projekt első 3 évében)

A projekt egyik fő célkitűzése egy olyan biobank létrehozása volt, mely széles korcsoportú, klinikai kezelés alatt nem álló személyek pszichológiai adatait (hangulati és kognitív jellemzők) és DNS mintáit tartalmazza. Ez az adatbank magában foglalja az előzetesen az NIH R03 TW007656 által támogatott munkában felvett mintákat is, melyek a projekt kezdetén rendelkezésre álltak. **A létrehozott PsychoData biobank a Semmelweis Biobank részét képezi, és projekt zárásának időpontjában az eredetileg tervezet N=700-as mintaszám helyett több mint 1500, fenotípusosan jellemzett személy DNS mintáit tartalmazza.** A bővítésre azért volt szükség, mert a szakirodalom jelen állása mellett sok SNP vizsgálatánál elengedhetetlen a statisztikai számítások többszörös tesztelésre való (Bonferroni) korrekciója, melyhez viszont optimális a minél magasabb mintaszám.

2. Optimalizált pszichológiai battéria kidolgozása (1. feladat) és alkalmazása (3. és 7. feladat).

A jelen kutatásban alkalmazott pszichológiai battéria **két részből állt**: **Az első részben nagy mintaszámú vizsgálatra alkalmas, önbeszámolón alapuló kérdőíveket alkalmaztunk**, melyek kialakításánál az NIH R03 TW007656 által támogatott munkában felhasznált kérdőíves eljárások tapasztalataiból indultunk ki, és a jelen munkába is bevontuk azokat a kérdőíveket, amelyek egészséges populáció esetében is megbízható és informatív eredményeket adtak (**agresszió, impulzivitás, szorongás és a depresszió szintjeit felmérő kérdőívek**). A kérdőíves vizsgálatokat valamennyi vizsgálati személynél elvégeztük.

A pszichológiai vizsgálatok **második részében** egy olyan **objektív, komputeres vizsgálati módszert** alkalmaztunk, melyek néhány fontos **kognitív paramétert mért** (pl. reakcióidő, vagy gátlási funkciók a **Stroop feladatban produkált teljesítménymutatók alapján**). Ehhez felhasználtuk munkatársunk, Székely Anna külföldi tapasztalatait a képmezegvezési

reakcióidő nemzetközi standardizálása vonatkozásában, valamint kidolgoztunk egy olyan szoftvert, mely alkalmas a gátlási funkciók mérésére szolgáló Stroop teszt felvételére és kiértékelésére. Az **idősebbek vizsgálatához** kidolgoztuk a komputeres feladatok olyan változatát, melyben az egeret a kísérletvezető kezeli, és a reakcióidő mérése minden feladatban mikrofon segítségével történik. A kognitív feladatok elvégzettetése állandó felügyeletet igényelt, ezért technikai levezetéséhez több hallgatót alkalmaztunk a projekt során.

3. A vizsgálandó polimorfizmusok prioritizálása és mérése (2, 4, 5, 8 és 10 feladatok).

3.1. SNP szelekció: Genetikai vizsgálatainkban olyan polimorfizmusokra kívántunk koncentrálni, melyekhez molekuláris funkció rendelhető. Újdonsága és epigenetikai vonatkozásai miatt a mikroRNS-ek kötőhely-polimorfizmusainak vizsgálatát tűztük ki célul, ezek közül is azokat, melyek pszichológiai-pszichiátriai kandidáns gének 3'UTR (untranslated region)-ben helyezkednek el. A felhasznált OpenArray rendszer adottságaiból adódóan a nanotechnológiával végzett genotipizálásban nx32 SNP-t vizsgálhattunk. A tervezett munkának megfelelően első lépésben előszűrést végeztünk: 2 x 32 olyan SNP vizsgálatát terveztük meg, melyek in silico adatbázisok alapján pszichogenetikai szempontból fontos gének feltételezett mikroRNS kötését változtatják meg. Ezen felül kiválasztottunk további 32 olyan SNP-t is, mely a szakirodalomban újabban felmerült és kognitív vonatkozásban relevánsnak tűnő kandidáns génekhez (pl. GDNF) társítható. Ezt követte az asszociációt mutató SNP-k génjeinek részletes analízise.

3.2. Az OpenArray (SNP chip) vizsgálatok technikai kiértékelése:

Bár az általunk használt nagyhatékonyságú genotipizáló módszert nem mi alkalmaztuk először, tapasztalataink azt mutatták, hogy a konvencionális kiértékelő szoftver nem ad maximálisan megbízható eredményeket. Ezért kifejlesztettünk és beadtunk nemzetközi szabadalmaztatási eljárást egy olyan módszerre, amely speciális digitális képfeldolgozási eljárásokkal és külső a priori információ (például kapcsoltsági csoportok és a Hardy-Weinberg egyensúly) felhasználásával elősegíti az optimális genetikai kiértékelést, és ha kívánatos, a mérések eredményéhez valószínűségi paramétereket is rendel. Ebből a munkából **SZABADALMI bejelentés született** (HU: 2012. 10. 30., P1200622; AU: 2013. 05. 24., 2013206020; EU: 2013. 05. 24., EP13169117; US: 2013. 05. 24., 13/900.543). A létrehozott kiértékelő programmal kapott genotípus eloszlások a legtöbb esetben igen jó közelítést a Hardy-Weinberg egyensúlynak (a projekt során összesen megvizsgált 96 SNP-ből csupán 4

db esetében kaptunk szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól), ami megalapozta a kapott eredmények közölhetőségét. A kidolgozott eljárás megbízhatóságát parallel DNS minták alkalmazásával, illetve az OpenArray rendszertől független genotipizálási módszerekkel (3 db SNP mérése más módszerrel 95% feletti azonosságot mutatott) igazoltuk.

3.3. Egyéb vizsgált polimorfizmusok:

A SNAP-25 gén esetében két olyan mikroRNS kötőhely polimorfizmust azonosítottunk az in silico vizsgálatok során, melyek egymáshoz igen közel helyezkednek el, és így hatásuk feltételezhetően együttesen érvényesül. Ezért kidolgoztunk egy olyan módszert, mely haplotípus-specifikus próbák felhasználásával közvetlenül alkalmas a haplotípus meghatározására (Kovács-Nagy és mtsai, 2011). Az SNP vizsgálatok mellett végeztünk még hosszúság-polimorfizmus vizsgálatokat (DRD4 3. exon VNTR és 5-HTTLPR) és gének kópiaszám (CNV) vizsgálatokat is.

3.4. A klasszikus (frekvencia) és oksági elemzésen alapuló (Bayes-i) pszichogenetikai asszociációvizsgálatok legfontosabb eredményei

A klasszikus statisztikai elemzések esetében több polimorfizmus egyidejű vizsgálatánál igen szigorú (Bonferroni) korrekciót szokás alkalmazni a többszörös tesztelés miatt. Ez az eljárás ugyan csökkenti a fals pozitív eredményeket, de megnöveli a fals negatív eredmények valószínűségét. Ezért a pszichogenetikai asszociációvizsgálatok során a klasszikus elemzések mellett többváltozós vizsgálatokat is végeztünk oksági elemzésen alapuló (Bayes-i) modellel (Sárközi és mtsai, 2011, Temesi és mtsai, 2014).

3.5. Pszichogenetikai asszociációs vizsgálataink eredményei a következőkben foglalhatók össze:

- Az impulzivitás genetikai hátterét vizsgálva mindkét számítási modellel kimutattuk a dopaminerg és a szerotonerg gének additív hatását (Varga és mtsai, 2012), valamint a SNAP-25 gén variánsainak szerepét (Németh és mtsai, 2014).
- Kimutattuk továbbá, hogy egy szerotonin receptor, a HTR2A gén rs7322347 SNP-je szintén szignifikáns összefüggést mutat az agresszióval széles korcsoportú mintán ($P=0,0007$), és ez a hatás a mért 64 SNP-re való Bonferroni korrekció után is szignifikáns marad (eredmények közzésre előkészítve).

- Az agresszió egy teljesen új kandidáns génjeként azonosítottuk a WFS1 gént (**Kovács-Nagy és mtsai, 2013**).
- A glia eredetű növekedési faktor (GDNF) egy új kandidáns gén a pszichogenetikai szakirodalomban. Vizsgálataink első fázisában összefüggést kaptunk a GDNF gén polimorfizmusai és a Stroop tesztben mért gátlási funkció között. Ezt az eredményt azonban a kibővített mintán nem tudtuk reprodukálni. Ugyanakkor szignifikáns összefüggést kaptunk a GDNF két polimorfizmusa és a szorongás HADS kérdőívvel mért mérőszámai között (**Kotyuk és mtsai, 2013**).
- Új eredményeket kaptunk a dopamin D4-es receptor valamint a szerotonin transzporter polimorfizmusok és a kognitív teljesítmény összefüggéseinek vonatkozásában (**Katona és mtsai, 2011**).
- Kimutattuk a dopamin D4-es receptor 3. exonjában található ismétlési polimorfizmus (DRD4 VNTR) összefüggését különböző kognitív feladatokban mért válaszadási sebességgel (**Székely és mtsai, 2011**).

4. Haplotípus vizsgálatok (10. feladat)

4.1. Kapcsolt asszociáló SNP-k esetében a haplotípusok vizsgálata további információt szolgálhat a molekuláris hatásmechanizmus vonatkozásában. A SNAP-25 gén esetében például a 3'-UTR 2 SNP-je egymáshoz igen közel lokalizálódik, és hatásuk feltételezhetően együttesen érvényesül. Ezért kidolgoztunk egy olyan molekuláris genetikai eljárást, amellyel egyedileg meg tudtuk határozni a kérdéses SNP-k haplotípusát, mely lehetővé tette a T-T haplotípus és az impulzivitás közti szignifikáns asszociáció kimutatását (**Németh és mtsai, 2013**).

4.2. Molekuláris haplotípus meghatározások kidolgozása azonban csak abban az esetben lehetséges, ha a kapcsolt SNP-k egymáshoz közel helyezkednek el. Ha ez a helyzet nem áll fenn, akkor lehetőség van ennek számítással való közelítésére megfelelő programok (Phase) segítségével. Ha a génen több SNP-t mérünk, a számítások is jó közelítést adhatnak. Ezt a módszert alkalmaztuk a GDNF gén vizsgálata esetében (**Kotyuk és mtsai, 2013**).

5. Pszichogenetikai asszociációt mutató allélvariánsok molekuláris-funkcionális vizsgálata. (6, 9. feladat)

A genetikai variánsok molekuláris hatásainak vonatkozásában a jelen projektben mikroRNS kötőhely polimorfizmusokra koncentráltunk. Két gén (WFS1 és SNAP-25) esetében kaptunk

szignifikáns összefüggést egy feltételezett mikroRNS kötőhely polimorfizmus és a mért fenotípusos változó között. **Molekuláris biológiai vizsgálataink mindkét esetben alátámasztották feltételezésünket, azaz az asszociáló SNP-knek megfelelő 3'UTR variánsok valóban hatással voltak az adott mikroRNS repressziós hatásának mértékére in vitro rendszerben. Részletesebben kifejtve:**

5.1. A WFS1 gént kapcsoltsági szempontból teljesen lefedő 17 SNP közül egyedül az rs 1046322 mutatott szignifikáns asszociációt a mért pszichológiai paraméterekkel. Ez az SNP a gén 3'UTR-jében helyezkedik el, nem kapcsol a többi SNP-vel, és in silico adatok szerint megváltoztathatja a miR-668 mikroRNS kötődését. A WFS1 gén teljes 3'UTR régióját luciferáz riporter rendszerbe klónozva kimutattuk, hogy a minor (A) allélvariáns esetében a kotranszfektált miR-668 mikroRNS-nek szignifikánsan alacsonyabb a represszív hatása a G allélvariánsnak megfelelő konstruktumhoz viszonyítva (**Kovács-Nagy és mtsai, 2013**).

5.2. A SNAP-25 gén promoter (rs6077690 és rs6039769) és 3'-UTR (rs3746544 és rs 1051312) polimorfizmusait vizsgálva azt kaptuk, hogy a feltételezett mikroRNS-kötőhely polimorfizmusok mutatnak szignifikáns összefüggést a vizsgált fenotípussal. Mivel a 3'UTR két vizsgált SNP-je az in silico adatok alapján együttesen befolyásolhatja a miR-641 mikroRNS kötődését, a SNAP-25 gén 3'UTR régióját tartalmazó konstruktumból a négyféle haplotípusnak megfelelően 4 variánsot hoztunk létre. MiR-641 kotranszfektációval mért relatív luciferáz aktivitás méréseink egyértelműen igazolták, hogy a legkisebb a mikroRNS repressziós hatása a G_C haplotípus esetében, míg a T-T haplotípusnál, ahol a mikroRNS a legerősebben kötődik, a repressziós hatás közel ötször erősebb. A másik két haplotípus hatása – a vártak megfelelően – ezen haplotípus-hatások között helyezkedik el. (**Németh és mtsai, 2014**)

6. A kognitív teljesítmény időskori romlásának genetikai vizsgálata (10. feladat)

A szakirodalmi adatokkal egybehangzóan az általunk vizsgált kognitív feladatokban is jelentősen nő idősebb korban a válaszadás reakcióideje és a hibázási szám. Például a Stroop teszt úgynevezett inkongruens feladataiban mind a hibázási szám, mind pedig a válaszadási idő átlaga az 51-95 éves korcsoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a fiatalabb korcsoportokban (reakcióidő: kor főhatás $p < 0.0001$; hibázási arány: kor főhatás $p < 0.0001$). Ugyanakkor azt a rendkívül érdekes eredményt kaptuk, hogy az ABCA1 gén rs1800977 (promóter régió) G alléljával homozigóta formában rendelkező idősök gyakorlatilag a fiatalokkal azonos szinten teljesítenek: a hibázási arány növekedése, illetve a lassulás

elsősorban az A allélt hordozóknál érzékelhető (hibázási arány gén/kor interakció $p=0.004$, gén főhatás az inkongruens próbák válaszadási időben: $p=0.037$; (Szekely és mtsai, 2013 konferencia absztrakt, publikáció folyamatban). Az ABCA1 gén terméke egy agyi koleszterin pumpa, mely igen fontos szerepet tölt be az agy koleszterin anyagcseréjében, ezért logikus kandidáns génje az öregkori kognitív teljesítmény variabilitásának.

7. A projektben vállalt feladatokon túlmutató eredmények, melyek további hazai és nemzetközi pályázatok alapját képezhetik

7.1. Bár a munkatervben nem szerepelt, de a legújabb szakirodalmi adatok alapján érdemesnek látszott megvizsgálni a GSK3B gén kópiaszám variánsainak (GSK3B CNV) előfordulását és pontos szerkezetét. Ezek a variánsok azonban az egészséges populációban igen ritkák voltak (4 /214), ugyanakkor bipoláris depresszióban igen jelentős rizikó faktorként jelent meg ($p=0.00001$, OR (odds ratio) =8.1), ami még kifejezettebb volt nők esetében (OD=19.7; Rónai és mtsai, 2014). A változó kópiaszámú régiókat feltérképezve azt kaptuk, hogy elsősorban a gén 3'UTR régiója amplifikálódott a betegekben, mely – ha átíródik a mRNS-be – mikroRNS kötőhely felesleget idézhet elő, ezáltal gátolva a mikroRNS hatását. Ez egy érdekes, a szakirodalomban teljesen új koncepció, melynek részletes kidolgozásához újabb támogatások elnyerésére lenne szükség.

7.2. A jelen projektben létrehozott, széles korcsoportú, egészséges populáció több mint 100 polimorfizmusát határoztuk meg. Míg az allélgyakoriságok általában nyilvánvalóan nem változnak a kor függvényében, a dopamin D4-es receptor úgynevezett „hosszú” alléljánál egy rendkívül jelentős feldúsulást tapasztaltunk egészséges öregekben, mely egyezik egy közelmúltban (2013) megjelent publikáció adataival. Mindazonáltal az a kérdés nyitva maradt, hogy mi lehet a funkcionális kapcsolat a DRD4 hosszú allél és az egészséges öregedés között.

HIVATKOZÁSOK:

Katonai RE, Szekely A, Sasvari-Szekely M: [Effect of dopaminergic and serotonergic gene variants on cognitive performance], Neuropsychopharmacol Hung, 2011

Kotyuk E, Keszler G, Nemeth N, Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Szekely A: Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) as a Novel Candidate Gene of Anxiety., PLOS ONE 8: (12) e80613, 2013

Kovacs-Nagy R, Sarkozy P, Hu J, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: Haplotyping of putative micro-RNA binding sites in the SNAP-25 gene, Electrophoresis 32, 2013-2020, 2011

Németh N, Kovács-Nagy R, Székely A, Sasvári-Székely M, Rónai Z.: Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene., PLoS One. 8(12):e84207., 2013

Ronai Z, Kovacs-Nagy R, Szantai E, Elek Z, Sasvari-Szekely M, Faludi G, Benkovits J, Rethelyi JM, Szekely A.: Glycogen synthase kinase 3 beta gene structural variants as possible risk factors of bipolar depression., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. Published online: 21 FEB 2014 | DOI: 10.1002/ajmg.b.32223, 2014

Sarkozy P, Marx P, Millinghoffer A, Varga G, Szekely A, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M, Antal P: Bayesian data analytic knowledge bases for genetic association studies., In: Arjen Hommersom, Peter Lucas (szerk.) The 13th Conference on Artificial Intelligence in Medicine (AIME'11), Bled, Szlovénia, 2011.07.02-06. pp. 55-66. Paper 6, 2011.

Szekely A, Balota DA, Duchek JM, Nemoda Z, Vereczkei A, Sasvari-Szekely M: Genetic factors of reaction time performance: DRD4 7-repeat allele associated with slower responses. Genes Brain Behav 10: (2) 129-136, 2011.

Székely A, Katonai Enikő R, Kotyuk E, Sasvari-Székely M: Új kandidáns gének a kognitív funkciók genetikai hátterének kutatásában, Magyar Pszichológiai Társaság XXII. Országos Tudományos Nagygyűlése Budapest, 2013. június 5-7., 2013

Temesi G, Bolgár B, Arany Á, Szalai C, Antal P, Mátyus P.: Early repositioning through Compound Set Enrichment Analysis: A knowledge recycling strategy, Future Medicinal Chemistry, in press, 2014

Varga G, Szekely A, Antal P, Sarkozy P, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M: Additive effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity, AM J MED GENET B 159 B: (3) 281-288, 2012