

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra genetiky a mikrobiologie**



**Populační studie polymorfizmu genu pro serotoninový  
transportér**

**Nikola Bílá**

Diplomová práce

Praha 2011

Vedoucím diplomové práce byl  
prof. MUDr. Milan Macek, DrSc. jr.

Vedoucí lékař Centra cystické fibrózy Ústavu biologie a lékařské genetiky,  
Univerzity Karlovy v Praze  
- 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Motole

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením uvedeného vedoucího diplomové práce a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.8.2011

#### Poděkování:

Je mou milou povinností poděkovat všem, kteří přispěli ke vzniku této diplomové práce. Děkuji především panu profesorovi za odborné vedení práce. Dále děkuji pracovníkům ÚBLG FN Motol a to zejména RNDr. Haně Kuželové a Mgr. Petře Křenkové za pomoc s laboratorním výzkumem a všem ostatním pracovníkům laboratoře za drobné i velké rady a nápomoc.

TITLE:

The serotonin transporter gene-polymorphism: an prevalence study in the Czech population .

SUMMARY:

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a neurotransmitter in the central and peripheral nervous systems. Serotonin transporter 5-HTT plays an important role in serotonergic transmission and the serotonin transporter gene is under investigation in connection with multiple psychiatric disorders. Three polymorphisms, an insertion/deletion and SNP in the promoter region and a variable nucleotide tandem repeat (VNTR) in intron 2, influence expression of the *5-HTT* gene. We examined these polymorphisms at the serotonin transporter protein locus (SLC6A4) in three specific and representative cohorts drawn from the Czech population. These cohorts were stratified according to their age: a) randomly selected elderly individuals (over 75 years of age), b) young adults (age ranging between 19- 45 years) and c) newborns, all with balanced gender representation.

The two regions were amplified and resolved on a 2% agarose gel and/or analyzed using the capillary electrophoresis in order to discriminate length polymorphisms. SNP in intron 2 was examined by RFLP after using *MspI* restriction. This analysis revealed that elderly individuals were statistically more likely than controls to carry two copies of the L allele of the length polymorphism. This may be due to the protective character of L allele, which is associated with lower susceptibility to bipolar affective disorder, depression, alcohol dependence and neuroticism.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Serotoninový transportér, 5-HTT, genetika, polymorfismus, psychiatrické onemocnění, dlouhověkost, transkripční účinnost, asociace, genetická náchylnost

KEYWORDS:

Serotonin transporter, 5-HTT, genetics, polymorphism, psychiatric disorder, longevity, transcriptional efficiency, association, genetic susceptibility

## OBSAH

1	Úvod .....	6
2	Literární Přehled .....	8
2.1	Významné geny v psychiatrii .....	8
2.1.1	Geny nacházející se na autozomech .....	9
2.1.2	Geny nacházející se na gonozomech .....	12
2.2	Serotonin .....	15
2.3	SLC6A4 .....	16
2.4	Asociační studie genu SLC6A4 a jejich možný vliv na dosažení vysokého dožitého věku .....	20
2.4.1	Psychické poruchy .....	20
2.4.2	Somatické poruchy .....	26
3	Materiál a metody .....	28
3.1	Vyšetřovaný vzorek .....	28
3.2	Přístroje a pomůcky .....	29
3.3	Chemikálie a spotřební materiál .....	30
3.4	Molekulárně genetické metody .....	31
4	Výsledky .....	37
4.1	Dvojalelické rozlišení .....	38
4.2	Trojalelické rozlišení .....	40
4.3	Intron 2 .....	41
5	Diskuze .....	43
6	Závěr .....	51
7	Souhrn .....	53
8	Seznam literatury .....	54

# 1 Úvod

Serotonin je neurotransmitter serotonergního systému tvořeného soustavou neuronů v prodloužené míše a dalších částech mozku. Účastní se procesů, podílejících se na vzniku a modulaci nálad a změny v jeho metabolismu mohou vést k depresivním stavům, podrážděnosti, až k agresivitě. Serotoninový transportér 5-HTT, zajišťující zpětný příjem serotoninu ze synaptické štěrby do neuronu, hraje důležitou roli v serotonergní neurotransmisí a gen kódující tento protein patří mezi nejsledovanější geny v souvislosti s psychiatrickými onemocněními. Jednotlivé alely tohoto genu vykazují nestejnou transkripční účinnost a jsou proto vyšetřovány v mnoha studiích v souvislosti s vlivem na rozvoj konkrétních duševních poruch. Nejčastěji studované polymorfizmy se nacházejí jak v regulační, tak v kódující oblasti genu a z molekulárně genetického hlediska patří do skupiny jednonukleotidových polymorfizmů tzv. SNP a minisatelitních opakování.

Parciální vlivy genetických faktorů na rozvoj psychiatrických onemocnění vytvářejí v populaci skupiny lidí více a méně náchylných k rozvoji onemocnění. Dále se ale podílejí například i na rozdílnosti odpovědi na léčbu, či specifickém průběhu onemocnění.

Mezi psychiatrické poruchy, jejichž výskyt je spojován s přítomností konkrétní alely genu pro serotoninový transportér, jsou například deprese, afektivní porucha, neuroticismus, závislost na návykových látkách a další nemoci negativně ovlivňující celkový zdravotní stav. Tato onemocnění jsou nezdědka spojována s výskytem sebevražedných sklónů, sebevražd a zkrácené délky života oproti průměru, a to i například v důsledku komorbiditních fyziologických onemocnění.

Mnoho studií se zabývá vazbou serotoninového transportéru a daného psychiatrického onemocnění převážně v souvislosti s jedním vybraným polymorfizmem a výsledky jsou vzhledem k povaze polymorfizmů neúplné. Není výjimkou, že se jednotlivé asociační studie ve svých závěrech liší. Jednou z komplikací při posuzování asociačních studií serotoninového transportéru je i rozdílné geografické zastoupení jednotlivých alel. V rámci tohoto výzkumu je jedním z dílčích cílů určení zastoupení jednotlivých alel pro náhodně vybraný vzorek z České republiky.

Hlavním cílem populační studie tří nejvýznamnějších polymorfizmů genu pro serotoninový transportér je stanovení jejich výskytu ve třech věkově rozdílně zvolených skupinách ze stejného geografického regionu a vzájemným porovnáním těchto skupin se pokusit zhodnotit vliv výskytu konkrétních variant polymorfizmů v genotypu na dosažení vyššího dožitého věku.

## 2 Literární Přehled

### 2.1 Významné geny v psychiatrii

Genů, sledovaných ve spojení s psychiatrickými poruchami, je mnoho. Epidemiologie psychiatrických poruch sestavují dohromady vlivy vnějšího prostředí s genetickým pozadím a snaží se nalézt s nimi asociované konkrétní geny a jejich polymorfizmy. Téměř vždy se ale u těchto genů jedná o kvantitativní zhodnocení vlivu mutace/polymorfizmu na výskyt poruchy, kdy daná mutace sama, nebo v kombinaci s dalšími přispívá k modulaci obecného systému v CNS. (Nejvíce se jedná o serotoninergní a dopaminergní systémy.)

Kauzální vlivy mutace na fenotyp v případě psychiatrických onemocnění nebyly prokázány, na druhou stranu pomocí srovnávacích analýz byly potvrzeny vlivy konkrétních haplotypů na asociaci se vznikem, modulaci průběhu či odpovědí na léčbu mnohých psychiatrických poruch.

Základní struktury genetických a environmentálních rizikových faktorů pro běžná psychiatrická onemocnění u mužů a žen jsou velmi podobné (Kendler et al. 2003).

Dosavadní výzkumy odhalují podíl genetického vlivu na rozvoj psychiatrických onemocnění, jako jsou závislost na návykových látkách, deprese, afektivní porucha či úzkostná porucha. U mnoha nemocí prozatím nebyl předpokládáný genetický vliv potvrzen. V následujícím přehledu jsou uvedeny geny, jejichž vliv na rozvoj, nebo průběh onemocnění byl již doložen.

Geny významné pro psychiatrické poruchy můžeme rozdělit podle systémů, ve kterých působí na geny dopaminergního systému, serotoninergního systému a ostatní. Dále můžeme uvažovat rozdělení podle systému dědičnosti, tedy leží-li daný gen na autozomu, či gonozomu, jak je patrné z tabulky 1.



### 2.1.1 Geny nacházející se na autozomech

#### ***DRD1***

Kóduje D1 receptor, který je nejpočetnějším dopaminovým receptorem v centrálním nervovém systému. Řídí neuronální a diferenciaci, zprostředkovává řadu behaviorálních odezev a upravuje aktivitu receptoru D2 ( McNab et al. 2009).

Genetická analýza *DRD1* umožnila identifikaci různých polymorfizmů umístěných uvnitř genu. Studie těchto polymorfizmů spojují gen *DRD1* s psychiatrickými poruchami typu závislosti na návykových látkách, například nikotinu (Huang et al. 2008) a s možným vlivem k rozvoji schizofrenie (Allen et al. 2008).

#### ***DRD2***

Kóduje receptor D2. *DRD2* gen kóduje dvě molekulárně odlišné izoformy s jinou funkcí (Uziel et al. 2000). V literatuře se můžeme setkat s označením izoforem L (presynaptická) a S (postsynaptická). Existuje mnoho polymorfizmů tohoto genu, nejznámější TaqI je spojován s výskytem užívání tabákových výrobků (Li et al. 2004) . *DRD2* je intenzivně studován v souvislosti s alkoholismem, a to zejména polymorfismus restrikčních fragmentů- RFLP u TagIA . Schindler et al. (2002) popisuje spojení mezi polymorfizmem promotorovým regionem genu a schizofrenií.

#### ***DRD3***

Gen pro receptor D3, lokalizován v limbických oblastech mozku, je spojený s kognitivní, emoční a endokrinní funkcí. Polymorfizmy genu tvoří Ser9 varianta, uváděna jako alela1 a Gly9 jako alela2. Souvislost tohoto genu s onemocněním schizofrenií je stále věc mnohých debat. Nicméně v některých studiích byla prokázána citlivost ke schizofrenii v souvislosti s *DRD3* genem (Lohmueller et al. 2003).

### ***DRD4***

48 párů bazí dlouhá repetice se v populaci vyskytuje nejčastěji ve 2, 4 a 7 opakování. Různý počet repetice však vytváří celých 25 rozdílných haplotypů tohoto genu. Rozdíly v počtu repetice byly studovány v souvislosti s „novelty seeking“, lidé hledající nové (Ebstein et al. 1996). Pozitivní asociace byla v některých studiích zjištěna s ADHD („Attention Deficit Hyperactivity Disorders“ - hyperaktivita s poruchou pozornosti) (Kustanovich et al. 2004), naproti tomu jiné studie tuto souvislost vyvrací (Kotler et al. 2000). Lopez Leon et al. (2005) popisují spojení genu s poruchami nálad a s bipolární afektivní poruchou. Jiné studie potvrzují asociaci *DRD4* s citlivostí pro alkoholismus (Muramatsu et al. 1996).

### ***DRD5***

Mikrosatelitové repetice (CT/GT/GA)<sub>n</sub> jsou zodpovědné za polymorfismus tohoto genu. Bylo popsáno 12 alelických variant. Některé z nich vykazují souvislost s různými typy dystonie (Placzek et al. 2001) Prokázané je podstatné spojení *DRD5* s ADHD (Lowe et al. 2004)

### ***SLC6A3***

Dopaminový transportér DAT, je kódován genem *SLC6A3* a zprostředkovává aktivní reuptake dopaminu ze synapsí. Je tak nejdůležitějším regulátorem dopaminergního systému. U tohoto genu byla zjištěna souvislost s onemocněními jako je Parkinsonova choroba, Tourettův syndrom nebo zneužíváním léků (Vandenberg et al. 1992).

### ***SLC6A4***

Gen kódující serotoninový transportér je zmiňován v souvislosti s celou řadou psychiatrických poruch. Polymorfismus v tomto genu ovlivňuje aktivitu serotoninového transportéru. Inzerce/delece 44 bp v regulační 5' oblasti vymezuje 2 alely genu, dlouhou (L) a krátkou (S). Dále bylo popsáno mnoho polymorfizmů v jednom nukleotidu. Studie polymorfizmů *5-HTT* popisují vliv na různé typy neuroticismu, depresí či úzkostných stavů (Lesch et al. 1996). Genu *SLC6A4* je dále věnována celá kapitola (viz str. 16).

### ***SLC6A11***

Hlavní inhibiční neurotransmitter kyseliny gama aminomáselné, GABA (Gamma-aminobutyric acid) je kódován tímto genem. GABA účinkuje na inhibičních synapsích v mozku vazbou na specifické transmembránové receptory v plazmatické membráně pre- i postsynaptických neuronových procesů. Tabakof et al. (2009) popisuje souvislost s tímto genem a závislostí na alkoholu.

### ***MAFDI***

Bipolární afektivní porucha je geneticky heterogenní komplexní onemocnění. Jedním z uvažovaných lokusů pro bipolární poruchu - *MAFDI* byl zmapován na chromozomu 18. Další poruchou spojovanou s *MAFDI* jsou stavy jak deprese jak s maniodepresivním tak klasickým průběhem (McMahon et al. 2001).

### ***PSENI, PSEN2***

Mutace v těchto genech hrají pravděpodobně roli v postižení člověka Alzheimerovou demencí (Landman et al. 2006). Studován je zejména vliv genetických variant a environmentálních faktorů na rozvoj tohoto onemocnění.

### ***ANONI***

Poruchy příjmu potravy, jako je anorexia nervosa, jsou komplexní poruchy, které mohou být ovlivněny mnoha geny. Jedním z genů pro susceptibilitu k anorexia nervosa je *ANONI* (Grice et al. 2002).

### ***SNRPN***

Mutace tohoto genu, konkrétně delece paternálních kopií imprintovaného genu, způsobuje syndrom nazvaný Prader- Willi (Horsthemke & Wagstaff 2008). Tento syndrom je spojen s obezitou, poruchami centrálního nervového systému a endokrinního systému a se sníženou inteligencí.

## 2.1.2 Geny nacházející se na gonozomech

### ***MECP2***

Mutace tohoto genu byly potvrzeny u pacientů s Rettovým syndromem (De Bona et al. 2000). Rettův syndrom je gonozomálně dominantní, progresivní neurologické vývojové onemocnění a je jednou z nejčastějších příčin mentální retardace u žen.

### ***CDKL5***

Produkt tohoto genu se nejvíce vyskytuje ve varlatech, mozku a brzlíku.

Studie prokazují souvislosti s projevem Rettova syndromu (Bienvenu and Chelly 2006).

### ***FMRI***

Hagerman and Hagerman (2004) poukazují na to, že mutace, konkrétně CGG repeticity tohoto genu se mohou projevit až třemi rozdílnými klinickými obtížemi ve spektru syndromu fragilního X chromozomu.

### ***GPR50***

Gen kódující receptor zpražený s G proteinem (GPCR – G protein-coupled receptor) je označení pro skupinu receptorů přítomných na cytoplazmatické membráně buněk. Hrají klíčovou roli v přenášení intracelulárních efektů mnoha neurotransmiterů a hormonů, například melatoninu. Thomson et al. (2005) považují mutace genu *GPR50* za hlavní kandidáty pro spojení s bipolární afektivní poruchou, depresivními poruchami a schizofrenií.

Tabulka 1. Významné geny v oblasti psychiatrických onemocnění.

	označení	název	poloha	polymorfizmy	souvislosti s chorobami	reference
DOPAMINERGNÍ SYSTÉM	<i>DRD1</i>	D1 dopamin receptor gene	5q	SNPs	Závislost na návykových látkách	Huang et al. (2008)
	<i>DRD2</i>	D2 dopamin receptor gene	11q	translokace	Závislost na návykových látkách	Li et al. (2004)
	<i>DRD3</i>	D3 dopamin receptor gene	3q	Ball polymorfizmus	Schizofrenie	Lohmueller et al. (2003)
	<i>DRD4</i>	D4 dopamin receptor gene	11p	VNTR	ADHD	Kustanovich et al. (2004)
	<i>DRD5</i>	D5 dopamin receptor gene	4p	není definován	ADHD	Lowe et al. (2004)
	<i>SLC6A3</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3	5p	SNPs	Závislost na návykových látkách	Vandenbergh et al. (1992)
	Serotonergní systém	<i>SLC6A4</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	17q	indel, SNPs	Deprese
Gabanergní systém	<i>SLC6A11</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11	3p	SNPs	Závislost na alkoholu	Tabakoff et al. (2009)

	<i>SNRPN</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	15q	mikrodelece	Prader-Willi syndrom	Horsthemke and Wagstaff (2008)
	<i>MAFD</i>	major affective disorder	18p	není definován	Bipolární afektivní poruha	McMahon et al. (2001)
	<i>ANON1</i>	susceptibility to anorexia nervosa	1q	není definován	Anorexia nervosa	Grice et al. (2002)
	<i>MECP2</i>	methyl-CpG-binding protein	Xq	posunové mutace	Rettův syndrom	De Bona et al. (2000)
	<i>CDKL5</i>	cyclin-dependent kinase-like 5	Xp	translokace	Rettův syndrom	Bienvenu and Chelly (2006)
	<i>GPR50</i>	G protein-coupled receptor 50	Xq	indel, SNP	Depresivní porucha Bipolární afektivní poruha	Thomson et al. (2005)
	<i>FMRI</i>	fragile X mental retardation 1	Xq	CGG repetice	Syndrom X fragilního chromozomu	Hagerman and Hagerman (2004)

## 2.2 Serotonin

Serotonin je biologicky aktivní látka, svou povahou řazena k monoaminovým neuromediátorům, podrobněji do skupiny indolaminů.

Molekuly serotoninu byly nalezeny u rostlin i mnohých zkoumaných živočichů. Jejich funkce zastává u různých druhů organismů mnoho podob. U rostlin funguje jako faktor růstu, u hlístic, např. u *C. Elegans* se podílí na řízení segmentace. U dalších bezobratlých je serotonin spojován s procesy učení. U savců zastává serotonin mnoho významných rolí ve funkci mozku, ale mimo to byl objeven téměř v každé savčí tkáni, nejvíce v testes a v intestine. V CNS se serotonin nejvíce vyskytuje v mozkovém kmeni. Z poznatků o serotoninu vyplývá, že se jedná o rozsáhle distribuovanou původní molekulu, jejíž existence předchází formaci nervového systému. (Jacobs & Azmitia 1992).

Na molekulární úrovni může serotonin spolu s BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a IGFs (insulin-like growth factors) stimulovat produkci proteinů zapojených do procesů adaptace na buněčný stres, růstu a obnovy, i neurogeneze, učení, paměti i přežívání buněk. Při pohledu na úlohu serotoninu ve spolupráci s faktory IGF a BDNF v energetickém metabolismu, adaptaci na stres a odolnosti k chorobám, zachovanou napříč různými druhy organismů můžeme předpokládat, že bude mít důležitou roli proti stárnutí organismu (Mattson et al. 2004).

U lidí nacházíme serotonin ve všech tkáních a tělních tekutinách. Tato látka umí ovlivňovat a měnit mnoho z biologických a behaviorálních funkcí, jako například sexualitu, agresi, apetit, lokomoční aktivitu, učení a paměť, spánek a hormonální sekreci a hraje roli v mnohých lidských onemocněních, například: deprese (Caspi et al. 2003), obsesivně-kompulzivní porucha (Ozaki et al. 2003), anorexia nervosa (Fumeron et al. 2001), bulimia nervosa (Di Bella 2000), autizmus (Conroy et al. 2004) a schizofrenie (Fan & Sklar 2005).

Serotonin, 5- hydroxytryptamin (5-HT) je syntetizován v mozku z aminokyseliny tryptofanu. Tryptofan je nepolární aminokyselina, kterou si tělo neumí vytvořit a musí se tedy do organismu dostávat v potravě. K syntéze serotoninu z L-tryptofanu je zapotřebí enzymů tryptofan hydroxylasy a amino acid dekarboxilasy. Po syntéze serotoninu následuje jeho uskladnění do vezikulů v terminální části axonu, chránících ho před degradací monoaminoxidasou B z vnějšího prostředí. Jeho uvolnění nastává až při vzniku akčního potenciálu a průniku  $Ca^{2+}$  iontů do vezikulu. Uvolněný serotonin interaguje v extracelulárním prostředí se svými receptory. Receptorů pro serotonin rozeznáváme 14. Liší se v množství, ve kterém se vyskytují i v přenosu odlišných informací na postsynaptické buňky.

Uvolněný serotonin je degradován monoaminoxidasou A, ale může být i přenesený zpět do serotonergního terminálu reuptake proteinem lokalizovaným na serotonin neuronovém výběžku. Energií pro tento zpětný přenos je kotransport iontů  $Na^{+}$  s větší koncentrací vně neuronů. Právě na zablokování funkce serotoninového transportéru, zprostředkujícího jeho reuptake, umožňující prodloužení periody výskytu serotoninu v extracelulárním prostoru, je založena velká část antidepressiv s takzvanými SSRIs (specific serotonin reuptake inhibitors).

Z výše uvedeného vyplývá, že za celkovou distribuci serotoninu je z velké míry zodpovědný protein, zprostředkující reuptake 5-HT, tedy serotoninový transportér 5-HTT (5- hydroxytryptamin transporter), a jeho míře exprese odpovídá běh celého serotonergního systému.

Lidský serotoninový transportér (5-HTT), zobrazený na obrázku 1, je kódován jediným genem, nacházejícím se na chromozomu 17q11.2 s názvem *SLC6A4*.

## 2.3 *SLC6A4*

Tento gen kóduje integrální membránový protein, který transportuje neurotransmitter serotonin ze synaptické štěrby do presynaptických neuronů, sodík-dependentní serotoninový transportér.

Gen pro serotoninový transportér je nazýván *SLC6A4* podle solute carrier family 6, member 4, další nejběžněji používané názvy jsou 5- *HTT* či *SERT*, dále se používá označení *Slc6a4* u myši.



V lidském genomu je lokalizován na 17. chromozomu, konkrétně v pozici 17q11.1-q12. Velikostně není nijak výjimečný, obsahuje 14 exonů a 31kpb.

Serotoninový transportér ovlivňuje všechny serotonergní systémy prostřednictvím regulace dopravy a tedy dostupnosti serotoninu, jeho homo a hetero receptorům v mozku, krvi a periferních orgánech.

Změny ve fungování serotoninového přenašeče vedou ke změnám funkce receptorů pro serotonin, jeho syntézy i metabolismu. Tyto souvislosti vedly k významu klinického využívání inhibitorů serotoninového transportéru, při léčbách různých poruch spojených s poruchou serotoninového přenosu. Tyto inhibitory patří v dnešní době mezi nejvíce široce-předepisované léky k léčbě neuropsychiatrických poruch.

Polymorfizmy tohoto genu byly poprvé popsány Heils et al. (1995,1996) a Ogilvie et al. (1996) a staly se předmětem stále neutuchajícího zájmu výzkumu genetiky psychiatrických onemocnění spojených s funkcí serotonergního systému. Později byly popsány další polymorfizmy tohoto genu, přičemž hlavní oblastí zájmu u těchto polymorfizmů je *in vivo* syntéza serotoninového transportéru, kterou varianty genu ovlivňují.

Oblasti výskytu polymorfizmů významných pro expresi genu se nacházejí v oblastech 5'UTR a ve 2. intronu genu jak ukazuje obrázek 2. Nejedná se tedy o změny sekvenční, ale regulační.

V 5'UTR, tedy v netranslatovatelné promotorové oblasti genu byly popsány 2 základní polymorfizmy. Lesch et al. (1996) pojmenoval délkový polymorfismus 5-HTTLPR (5-HTT Lenth Polymorphism) a určil jeho jednotlivé zastoupení alel v populaci. 5-HTTLTR je tvořen rozdílem 44 párů bazí, tedy inzercí či delecí, někdy zkráceně označováno jako „indel“. Dlouhá varianta nazývaná L (z anglického Long) je tvořena 16ti repetice 22pb dlouhého elementu, varianta S (z anglického Short) obsahuje 14 repetice (Obrázek 1,2). Tento polymorfismus se nachází v oblasti přibližně 1 kb upstream od místa iniciace transkripce a je nejvíce diskutován v asociačních studiích psychiatrických onemocnění. Lech et al. (1996) určil rozložení alel v populaci na 57% pro L a 43% pro S. Následující studie ale poukázaly na poměrně značné rozdíly v rozložení alel v různých geografických regionech, například Gerretsen, Pollock (2008) uvádějí převažující výskyt S alely nad L alelou v asijské populaci.

Dalším polymorfizmem regionu 5'UTR je jednonukleotidová záměna rs25531. Protože se nachází přímo v oblasti polymorfizmu 5-HTTLPR, přispívá k regulaci genové exprese prostřednictvím přítomnosti, či nepřítomnosti na L alele.

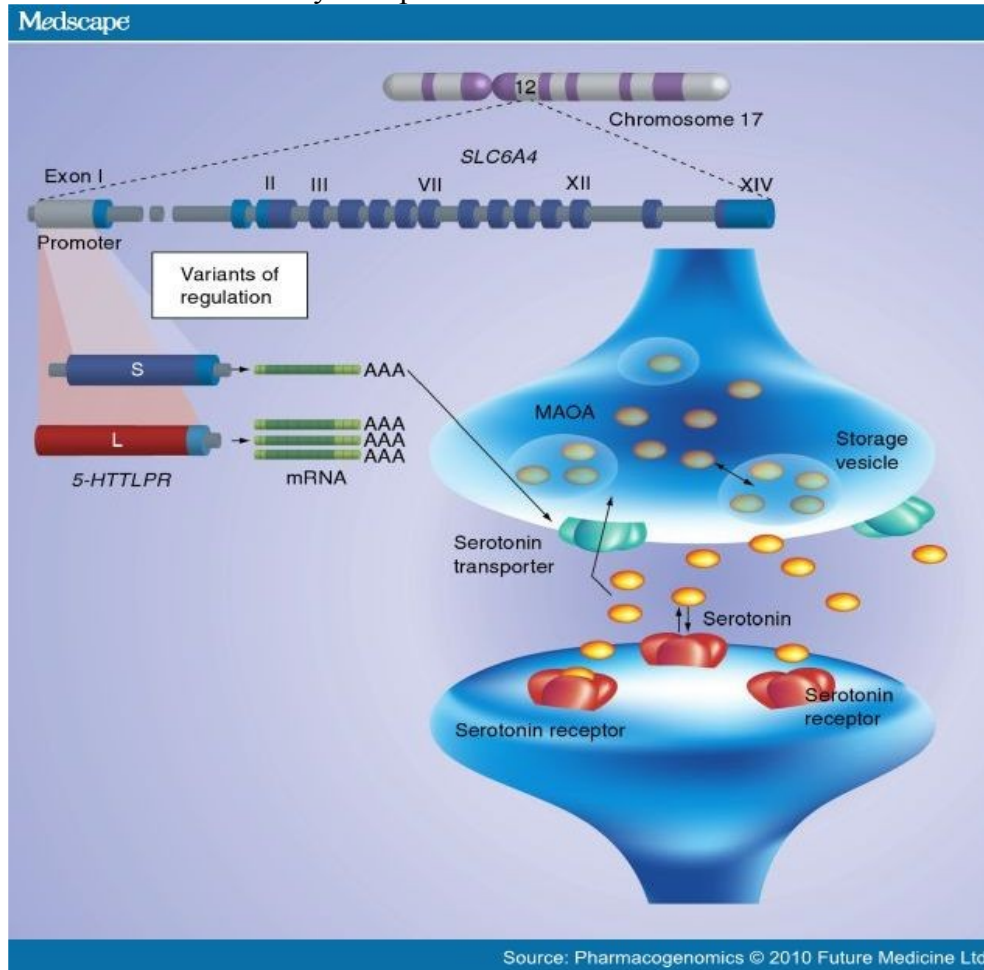
Původní adenin, může být zaměněn za guanin a negativně ovlivnit regulaci exprese genu. Podle míry exprese tedy můžeme rozlišovat trojalelický systém tohoto polymorfizmu. Alela La, tedy dlouhá varianta bez jednonukleotidové záměny má nejvyšší transkripční účinnost, alela Lg, tedy dlouhá varianta se zaměněným guaninem, má nižší transkripční účinnost a alela S nejnižší nebo srovnatelnou s Lg (Hu et al. 2006).

Polymorfizmus nacházející se v oblasti 2. intronu je označován jako STin2. Je tvořen rozdílným počtem tandemových repetitivních VNTR (Obrázek 2), 17pb dlouhých minisatelitů a rozlišujeme u něj 3 alely. Výsledky ohledně efektivity jednotlivých alel nejsou zatím konzistentní. Alela s 9ti opakováními STin2.9 vykazující větší transkripční účinnost genu oproti alelám STin2.10 a STin2.12 s 10ti respektive 12ti opakováními (Mrazek et al. 2009). Naproti tomu MacKenzie & Quinn (1999) uvádějí, že zatímco biologické funkce tohoto polymorfizmu je nejasná alela STin2.12 vykazuje větší transkripční aktivitu než STin2.10.

Ačkoliv polymorfizmů genu bylo popsáno více, výše uvedené tři jsou prokazatelně spojeny s vlivem na míru exprese genu. Rozdílná exprese genu jednotlivých alel byla prokázána v kulturách linií lymfoblastových buněk.

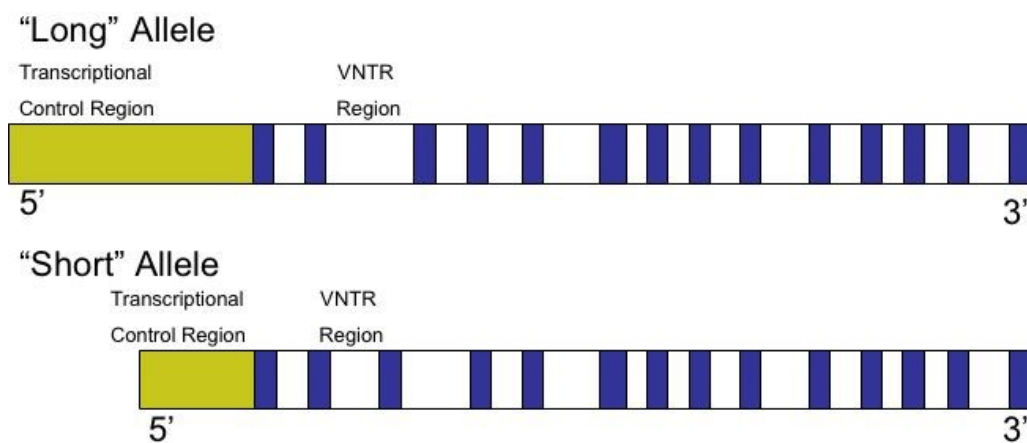
Knokauty genu *Slc6a4* u myši vedou v případě  $-/-$  genotypu, kde jsou obě dvě alely genu inaktivovány, k behaviorálním i fyziologickým změnám, naproti haploinsuficientnímu  $-/+$  genotypu kde je vyražena z funkce pouze jedna alela, bez pozorovaných změn (Ansorge et al. 2004).

Obrázek 1. Serotoninový transportér a neurotransmise



(<http://img.medscape.com/article/730/315/730315-fig3.jpg>)

Obrázek 2. Vybrané polymorfizmy genu *SLC6A4*



(<http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/2004/Cobain/angergene.html>)

## **2.4 Asociační studie genu SLC6A4 a jejich možný vliv na dosažení vysokého dožitého věku**

Serotonin a jeho distribuci ovlivňující serotoninový transportér, společně modulující serotonergní systém jsou spojovány s modulací nálad a psychických stavů, řízení různých fyziologických funkcí v lidském těle a s dalšími mnoha procesy. Dysfunkce serotonergního systému vedoucí k závažným emočním, sociologickým i fyziologickým změnám byly potvrzeny na zvířecích modelech (Ansorge et al. 2004, MacLean et al. 2004). Je tedy zřejmé, že asociační studie polymorfizmů genu pro serotoninový transportér, ať už jednotlivých, v kombinaci s polymorfizmy dalších genů, a bezpochyby i ve spojení s environmentálními vlivy, procházejí napříč medicínským spektrem od psychologie po fyziologii.

Nejvíce se studie v poslední době zaměřují na komplexní srovnávací studie neboli metaanalýzy daných asociací. Vzhledem ke slabým účinkům daných polymorfizmů a často protichůdným závěrům o jejich působení se metaanalýzy zabývají danou problematikou napříč více studiemi a polymorfizmus pak hodnotí na pozadí až tisíců zkoumaných vzorků a pacientů. Výsledky tedy přináší značně heterogenní výsledky, avšak potvrzují či vyvracejí vliv daného polymorfizmu na fenotyp.

Pro náš výzkum jsou důležité asociační studie polymorfizmů genu SLC6A4, které by mohly být faktory ovlivňující hodnotu dožitého věku a celkový zdravotní stav. Ačkoliv jsou tyto faktory vždy multikomplexy vnějších vlivů prostředí a genetických vlivů, díky rozsáhlým analýzám tohoto genu dnes můžeme vyčlenit ty, u kterých je působení jednoznačně prokázáno a podloženo sofistikovaným výzkumem. Dále je třeba vzít v potaz i studie týkající se rozdílné odpovědi na léčbu daných onemocnění v asociaci s konkrétními alelami genu. Stručně jsou některá data asociačních studií uvedena v tabulce 2.

### **2.4.1 Psychické poruchy**

Deprese, depresivní porucha

Podle Americké psychiatrické asociace (2000) je depresivní porucha charakterizována jednou nebo více depresivními epizodami, které přesahují délky 2 týdnů. Tyto stavy jsou charakterizovány ztrátou zájmu či potěšení téměř ve všech činnostech, dále pak

musí být přítomny alespoň čtyři z příznaků, jako jsou změny chuti k jídlu, hmotnosti, potíže se spánkem, změny psychomotorické, pokles energie, pocity bezcennosti nebo viny, potíže s přemýšlením, se soustředěním nebo při rozhodování, opakující se myšlenky na smrt, nebo sebevražedné sklony, plány nebo pokusy. Tyto stavy jsou doprovázeny úzkostí nebo poškozením ve společenské, pracovní, nebo jiné důležité oblasti působení. Depresivní porucha se často u pacientů opakuje a u 15% končí sebevraždou.

Caspi et al. (2003) prokázal souvislost s polymorfizmem 5-HTTLPR a depresiemi vzniklými působením stresujících zážitků. U lidí nesoucích 1 nebo 2 kopie S alely se po stresujících zkušenostech objevily deprese častěji nežli u nositelů L alely. Grabe et al. (2005) ve své studii otestoval 1005 subjektů a podpořil teorii vlivu S alely v kombinaci s vlivy prostředí na vznik deprese. Tato studie ovšem prokázala souvislost nositelství S alely se vznikem depresivních stavů pouze u ženského pohlaví.

Vliv polymorfizmu 5-HTTLPR na rozvoj depresivních stavů v kombinaci s vlivy prostředí potvrzuje i studie na mladých lidech, kde opět ženy, nositelky jedné nebo dvou S alel vykazují větší náchylnost k rozvoji těchto obtíží (Hammen et al. 2010). Naproti tomu Baune et al. (2008) popisuje zvýšený výskyt depresí u žen s L/L a La/La genotypem, tedy fenotypově se zvýšenou genovou expresí, přičemž se jedná o takzvaný druh melancholické deprese, která se vyznačuje diurnálními změnami nálad a tvoří 10% z diagnostikovaných depresivních poruch.

U pacientů s chronickým onemocněním srdce, nesoucích S alelu 5-HTTLPR je pozorována vyšší náchylnost k depresi, zvýšené vnímání stresu, a vysoká sekrece noradrenalinu. Tyto faktory mohou u těchto pacientů přispívat např. ke zhoršení kardiovaskulárních funkcí (Otte et al. 2007).

Významná je i variabilita mezi genotypy v souvislosti s účinkem nejběžněji podávané medikace depresivních stavů, léčiv typu SSRI, z anglického "selective serotonin reuptake inhibitors", selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. SSRI fungují na principu zablokování serotoninového transportéru a prodloužení periody výskytu serotoninu v synaptické štěrbině. Jejich efektivita působení a případné nežádoucí účinky jsou logicky intenzivně zkoumány v souvislosti s polymorfizmy serotoninového transportéru. Nejznámější látkou SSRI je fluoxetin, používaný pod různými obchodními názvy.

Studie na čínské populaci prokázala vyšší efektivitu léčby látkou zvanou fluoxetin, patřící do skupiny SSRI, u pacientů s haplotypem L/L 5-HTTLPR v porovnání s pacienty nesoucími S alelu (Yu et al. 2002).

U různých populací se vliv polymorfizmů zdá rozdílný. U bělošské populace vykazují nejnižší účinek léčby pacienti s S/S haplotypem 5-HTTLPR, narozdíl od asijské populace, kde je nenižší účinek léčby popisován pro haplotyp 10/12 STin2 (Smits et al. 2004).

U pacientů s depresivní poruchou ve věku nad 65 let se S alela 5-HTTLPR jeví jako nejméně účinná při léčbě pomocí SSRI. Pacienti nesoucí krátkou verzi genu zažili více závažných nežádoucích účinků během průběhu studia a jejich léčba byla více přerušovaná. Denní dávky léčiv byly nižší nežli u ostatních pacientů nesoucích dlouhou variantu genu (Murphy et al. 2004).

#### Bipolární afektivní porucha BAP

Bipolární porucha je charakterizována výraznými výkyvy nálady, myšlení, tělesné a psychické aktivity a chování. U pacientů se střídají stavy mánie (manické psychózy) a deprese. Manické stavy se projevují zvýšenou aktivitou, dobrou náladou, podnikavostí, často i zvýšeným sexuálním apetitem. Tyto epizody jsou střídány depresivními, u kterých je pacient naopak málo aktivní bez zájmu o okolní dění, často s pocity bezcennosti a bez schopnosti prožívat radost. V depresivních epizodách, ale i mimo ně hrozí pacientům sklony k sebevraždě (Ryu et al. 2010).

Ogilvie et al. (1996) popisuje zvýšený výskyt alely STin2.9 u pacientů postižených afektivní poruchou oproti kontrolním skupinám.

Cho et al. (2005) pomocí srovnávací studie potvrdil vliv polymorfizmů 5-HTTLPR a STin2 na výskyt BAP, i když výsledky této studie ukazují, že vliv je minoritní, u sledovaných pacientů byla oproti kontrolám zjištěna zvýšená přítomnost alely STin2.12. Lasky-Su et al. (2005) ve své studii prokázal souvislost s polymorfizmem 5-HTTLPR, konkrétně alelou S a potvrdil její častější výskyt v homozygotní formě u pacientů s BAP oproti kontrolám.

## Závislost na alkoholu

Závislost na alkoholu, nebo zvýšená náchylnost k jeho užívání je opět multifaktoriální jev, spojený s vlivy vnějšího prostředí i genetickými. Přes různorodost tohoto onemocnění lze s jistotou prokázat negativní působení požívání většího množství alkoholu jak na fyzické tak psychické zdraví. Jako sekundární onemocnění se u alkoholismu vyskytují onemocnění jater, slinivky břišní, ledvin, mozku a srdce, a trvalé poškození některého z orgánů může vést až k úmrtí pacienta. Průměrná délka života alkoholiků může být kratší, než odpovídá průměrné populaci.

Spojitost serotoninového transportéru a závislosti na alkoholu prokázal Feinn et al. (2005). V své studii uvádí vyšší riziko vzniku alkoholové závislosti (AD) s polymorfizmem 5-HTTLPR, konkrétně s haplotypem S/S. Homozygoti pro S alelu dále vykazovali těžší průběh AD, současný výskyt dalších nemocí- komorbiditu a závislost se u nich projevila dříve.

Munafò et al. (2005) se zabýval porovnáním věku, pohlaví a polymorfizmem 5-HTTLPR v souvislosti s konzumací alkoholu. Podle jeho výsledků jsou muži nesoucí jednu nebo dvě S alely signifikantně více náchylní ke konzumaci většího množství alkoholu, naproti tomu ženy vykazují tento efekt nejvíce při haplotypu S/L oproti oběma homozygotním skupinám.

Herman et al. (2003) poukázal na souvislost přítomnosti S/S haplotypu a rizikem k vyšší spotřebě alkoholu u dospívajících.

## Závislost na nikotinu

Kouření je nejvýznamnější preventabilní příčinou chorob na světě. Nejčastěji vede ke vzniku malignit plic, dutiny ústní, laryngu, močového měchýře, ledvin a pankreatu. Silně zvyšuje incidenci a mortalitu na srdeční infarkt a trombózu. Charakteristika závislosti na tabákových výrobcích je přirovnávána k závislosti na drogách, jako je kokain, či heroin. Celoživotní závislost na tabákových výrobcích může pacientům zkrátit průměrnou délku života až o 14 let, přitom se jedná o široce rozšířenou závislost postihující zhruba 5- 25% obyvatelstva Evropy (European Medicines Agency 2007).

Asociaci serotoninového transportéru s kouřením popsal Kremer et al. (2005). Haplotypy L/L u 5-HTTLPR a 12/12 u STin2 byly častěji přítomny u osob závislých na kouření, oproti nekuřákům, avšak při studiu intenzity závislosti nebyly objeveny žádné asociace.

Gerra et al. (2005) ve studii na mladých lidech objevil vyšší výskyt S alely 5-HTTLPR u skupiny závislých na nikotinu oproti nekuřákům, současně se tato alela vyskytovala více u časněji začínajících a těžších kuřáků, nežli u těch kteří začali kouřit později a s menší intenzitou.

Nositelé S alely 5-HTTLPR dále vykazují mnohem větší potíže při snaze skončit s kouřením oproti nositelům alely L a v této souvislosti se u nich může rozvinout neuroticismus (Hu et al. 2000)

### Sebevražedné chování

Sebevraždy mohou být následkem psychických onemocnění, jako jsou deprese či závislost na návykových látkách. Objevují se ale i u zdravých lidí bez zjevné příčiny. Tento jev je ovlivněn multifaktoriálně, jak prostředím, tak geneticky a v různých geografických oblastech se vyskytuje rozdílně.

Podle českého statistického úřadu v období let 2001–2005 bylo v Česku zaznamenáno 8023 sebevražd což tvoří 1,48 % celkového počtu úmrtí.

Posmrtné vyšetření obětí sebevražd obvykle zobrazuje nízký počet transportérů ve ventrální prefrontální kůře mozku, konkrétně v případech obětí sebevražd nezávislých na depresích (Mann et al. 2000).

Studie polymorfizmů serotoninového transportéru asociovaných se sebevražedným chováním se velmi rozcházejí.

Gaysina et al. (2006) ve své studii na ruské populaci popisuje souvislost s haplotypem L/L polymorfizmu 5-HTTLPR a zvýšeným výskytem sebevražedného chování u žen. V této studii nebyla prokázána žádná souvislost sebevražedného chování a délkového polymorfizmu u mužů a ani u jednoho pohlaví v asociaci s polymorfizmem STin2.

Naproti tomu Bondy et al. (2000) ve své studii na německé populaci uvádí zvýšený výskyt haplotypů S/L a S/S polymorfizmu 5-HTTLPR u obětí sebevražd oproti kontrolním vzorkům zdravých lidí ze stejné geografické oblasti.

Anguelova et al. (2003) ve srovnávací studii nachází asociaci se sebevražednými sklony a vyšším výskytem alely S u 5-HTTLPR.



## Poruchy příjmu potravy

Anorexia nervosa (AN) a Bulimia nervosa (BN)

Poruchy příjmu potravy zahrnující nekontrolovatelné přejídání se s následnou snahou zbavení se přijatého jídla a hladovění jsou civilizačními chorobami multifaktoriálního charakteru. Při dlouhodobém trvání může u pacientů docházet k závažným zdravotním potížím, selhávání orgánů, v extrémních případech ke smrti.

Možná souvislost serotoninového transportéru s poruchami příjmu potravy je opodstatněná, neboť hladina serotoninu je spojena mimo jiné s příjmem potravy.

Gorwood (2004) provedl srovnávací analýzu, která ukázala, že S alela 5-HTTLPR by mohla představovat minoritní, ale významný faktor, který zvyšuje riziko vzniku mentální anorexie.

Ačkoliv výsledky studie ukazují, že délkový polymorfismus 5-HTTLPR může u AN a BN hrát rozdílné role, osoby nesoucí jednu nebo obě S alely vykazují sedmkrát zvýšené riziko výskytu bulimia nervosa oproti kontrolám (Di Bella 2000).

Studie asociací 5-HTTLPR u různých skupin žen s AN prokázaly souvislost s přítomností S alely a dlouhodobého průběhu onemocnění (Fumeron 2001).

Matsushita et al. (2004) uvádí, že S alela polymorfizmu 5-HTTLPR může hrát roli v rozvoji AN prokazatelně více nežli alela L.

## Neuroticismus

Neuroticismus je náchylnost k emocionální a duševní labilitě. Lidé trpící neurotismem jsou náchylní ke zvýšené psychické tenzi, úzkostem a strachům, které mohou vést k neuróze.

Lesch et al. (1996) popsal výskyt S alely 5-HTTLPR v souvislosti s vyšším výskytem neuroticismu jak u dvou nezávislých skupin osob, tak u genealogických studií rodin.

Serotoninový transportér a jeho polymorfismus ve 2. intronu by mohl vykazovat spojitost s neuroticismem. Konkrétně alela STin2.10 se objevila u lidí s nižší náchylností k tomuto stavu (Kazantseva et al. 2008).

Neuroticismus se může vyskytnout i při snaze skončit s návykem na nikotin. Tento jev byl zvýšený u sledovaných kuřáků v asociaci s 5-HTTLPR konkrétně s nositeli S alely (Hu et al. 2000).

## Schizofrenie

Schizofrenie, její léčba a životní styl pacientů vedou k vyššímu počtu úmrtí u lidí trpících touto chorobou. Zejména špatná fyzická kondice, diety a kouření jsou faktory podepisující se na zvýšení mortality u těchto pacientů oproti běžné populaci (Pack 2009).

Fan & Sklar (2005) podle rozsáhlé studie označují variantu Stin2.12 v 2. intronu genu pro serotoninový transportér jako jeden z rizikových faktorů náchylnosti k rozvoji schizofrenie.

### 2.4.2 Somatické poruchy

#### Plicní hypertenze

Plicní hypertenze je syndrom zvýšeného krevního tlaku v plicnici, zvýšeného plicního cévního odporu, anebo obou. Primární plicní hypertenze (s neznámou příčinou) je vzácná, i když velmi těžká forma tohoto onemocnění. Artérie jsou poškozovány nadměrnou proliferací a koncentrací buněk hladkého svalstva a tím zabraňují správnému přísunu krve.

Eddahibi et al. (2001) poukázal na výskyt zvýšeného nárůstu buněk hladkého svalstva v plicních artériích pacientů s plicní hypertenzí, kteří byly nositeli L/L haplotypu polymorfizmu 5-HTTLPR. Podle jeho výzkumu hraje délkový polymorfizmus roli v patogenitě primární pulmonární hypertenze (PPH).

K podobným výsledkům dospěl Eddahibi et al. (2003) při výzkumu u pacientů s chronickou obstrukční plicní chorobou. Ta je charakterizována omezeným průtokem vzduchu v průduškách a zánětlivou odpovědí plic na škodlivé plyny nebo částice vznikající především při kouření a v České republice zaujímá 5. místo v příčinách úmrtí.

Přítomnost L/L haplotypu asociovala s vyšším růstem buněk hladkého svalstva v artérii více než u S/L a S/S. Eddahibi et al (2003) uvádí, že genotyp 5-HTTLPR ovlivňuje závažnost plicní hypertenze u této choroby.

Tabulka 2. Shrnutí asociačních studií genu *SLC6A4*

Asociace	Pohlaví	Haplotyp	Transkripční účinnost
Deprese	♀♂	S/-	-
	♀	S/-	-
Melancholická deprese	♀	L/L	+
	♀	La/La	+
BAP	♀♂	9/-	+
	♀♂	12/-	-
	♀♂	S/-	-
Sebevražedné chování	♀	L/L	+
	♀♂	S/-	-
Poruchy příjmu potravy	♀♂	S/-	-
Neuroticismus	♀♂	S/-	-
Schizofrenie	♀♂	12/-	-
Závislost na alkoholu	♀♂	S/S	-
	♂	S/-	-
	♀	S/L	=
Závislost na nikotinu	♀♂	L/L	+
	♀♂	12/12	-
	♀♂	S/-	-
Plicní hypertenze	♀♂	L/L	+

*Vysvětlivky:*

- + alela vykazuje vyšší transkripční účinnost
- alela vykazuje nižší transkripční účinnost
- = alela není charakteristická vyšší či nižší transkripční účinností

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Vyšetřovaný vzorek

Pro experimentální část byly zvoleny tři věkově rozdílné skupiny s poměrným zastoupením obou pohlaví, pocházející ze stejné geografické oblasti. Největší skupina číslo 1 je tvořena lidmi dosahujícími v době odběru krve 75 let věku a více. U této skupiny, dále existují lékařské záznamy, díky kterým lze soubor rozdělit na tzv. ambulatory a non-ambulatory osoby. Ambulatory (v překladu chodící) je skupina vyšetřovaných lidí, bez chronických onemocnění, či dlouhodobé hospitalizace. Non-ambulatory skupinu tvoří naopak lidé hospitalizovaní v léčebnách typu LDN, či s chronickým onemocněním, vyžadujícím dlouhodobou lékařskou či jinou léčebnou péči. Skupina číslo 2 je tvořena vzorky lidí středního (reprodukčního) věku a skupina číslo 3 novorozeneckými vzorky DNA. Počty jednotlivých vzorků shrnuje tabulka 3. Vybrané vzorky pocházejí z genetických vyšetření, které se vykonávají na pracovišti ÚBLG ve FN Motol a jsou používány na základě informovaného souhlasu pacientů o dalším zpracování pro výzkumné účely a uchování genetického materiálu. Koncentrovaná DNA se skladuje při teplotě  $-20$  až  $-70^{\circ}\text{C}$ , ředěná DNA, používaná pro klasickou PCR je skladována v teplotě  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tabulka 3. Počty jednotlivých vzorků ve skupinách

		pohlaví		celkem
		žena	muž	
SKUPINA	1	49	48	97
	2	76	50	126
	3	11	27	38
	2+3	87	77	164

### 3.2 **Přístroje a pomůcky**

V této diplomové práci byly použity následující přístroje a pomůcky:

#### *Termocyklery*

- Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
- XP cycler, Bioer Technology, Hangzhou, China
- PTC 200, MJ Research, San Francisco, CA, USA
- PTC 220, MJ Research, San Francisco, CA, USA

#### *Centrifugy*

- Mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Spectrafuge 16M, Labnet, Windsdor, Velká Británie

#### *Vortex*

- MS2 Minishaker, IKA-Works, Wilmington, NC, USA

#### *Elektroforetická vana a proudový zdroj*

- Horizont 58, Life Technologies, Gaithersbutg, MD, USA
- Lightning Volt Power Supply, Polysciences, Neles, IL, USA

#### *UV transiluminátor a gelový dokumentační systém*

- Electronic Transilluminator Dual Light, Ultralum, Claremont, CA, USA
- EDAS 290 + Kodak ID Image Analysis Software, Eastman Kodak Copany, Orchester, NY, USA

#### *Zkumavkový inkubátor*

- AccuBlock Digital dry Bath, D1100, Labnet, Woodbridge, NJ, USA

#### *Kapilární genetický analyzátor*

- ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

#### *Vertikální laminární box*

- Bio-II-A, Telstar, USA

#### *Pipety a špičky*

- Pipetman (P2, P10, P20, P100, P200, P1000), Gilson, Middleton, WI, USA
- Distriman, Gilson, Middleton, WI, USA
- špičky 10 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson, Middleton, WI, USA
- špičky DistriTip Mini 1 µl-12,5 µl , 10 µl-125 µl, Gilson, Middleton, WI, USA

### **3.3 Chemikálie a spotřební materiál**

V této diplomové práci byly použity následující chemikálie:

- 2X Qiagen multiplex PCR master mix (Qiagen)
- 5X Q- solution (Qiagen)
- RNase- free water (Qiagen)
- Fast digest buffer 10x (Fermentas)
- Fast digest MspI (Fermentas)
- Restrikční enzym MspI (Fermentas)
- primery pro gen *SLC6A4* (QIAGEN)
- BigDye terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen)
- HiDi Formamid (Applied Biosystems)
- GeneScan<sup>TM</sup>-500 ROX<sup>TM</sup> Size Standard (Applied Biosystems)
- Agaróza (Serva)
- Orange G (Sigma)
- 6X Loading Dye Solution (100bpDNA ladder) (Fermentas)
- Ethidium bromid 1,5µl/ml
- 10X TBE pufr
- Octan sodný 3M
- Ethanol 100%

V této diplomové práci byl použit následující spotřební materiál:

- 96 jamková platíčka MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)
- 96 Well Plate Septa (Applied Biosystems)
- zkumavky 0,2 ml, 1,5 ml (Neptune)
- zkumavky 0,1 ml Strip Tubes and Caps (Corbett Life Science)
- rukavice Dona SENSI plus (Vulkan)

### **3.4 Molekulárně genetické metody**

V této diplomové práci byly použity následující metody:

#### **Izolace**

DNA pro skupiny 1 a 2 byla izolována z plné krve, DNA pro skupinu 3 izolována z krevních skvrn (Guthrieho kartičky).

Izolace DNA byla provedena pracovníky ÚBLG FN Motol v Praze a to jednak z plné krve pomocí Gentra Purgene Blood Kit a jednak z Guthrieho karet pomocí forenzního kitu (INNUPREP Forensic Kit- Analytik Jena AG)

Koncentraci vyizolované DNA před použitím ověříme na přístroji nanodrop. Koncentrace DNA použité pro reakci byly u skupin 1 a 2: 50-100 $\mu$ l/ml, u skupiny 3: 5-10  $\mu$ l/ml.

#### **Polymerázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je v molekulární biologii nepostradatelnou a nejčastěji využívanou metodou. Díky PCR je možné amplifikovat geny a další sekvence DNA a během několika hodin milionkrát zvýšit koncentraci žádané oblasti.

K PCR je zapotřebí pufr, dvojmocné kationty, dNTP, Taq polymeráza, primery a voda. V našem experimentu jsme použily mastermix, který již obsahuje ve správném poměru většinu potřebných reagentů, dále Q- solution, primery fluorescenční i neznačené a vodu. Ideální koncentrace DNA je 100 ng/ $\mu$ l. Reakce jsme prováděli podle následujícího protokolu:

#### Protokol na 1 PCR reakci pro amplifikaci oblasti 5'UTR *SLC6A4*

Qiagen multiplex mastermix	5 $\mu$ l
Q- solution	1 $\mu$ l
Primer forward (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Primer reverse (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
RNase free watter	2,5 $\mu$ l
Vzorek DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Primery (fluorescenčně značené) použité pro amplifikaci 5'UTR oblasti *SLC6A4*:

Forward: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAAT- 3'

Reverse: 5'- GAGGGACTGAGUTGGACA-3'

Uvedené chemikálie opatrně smícháme a rozpipetujeme do předem popsáných mikrokumavek. Poté přidáváme jednotlivé vzorky DNA a vše důkladně promícháme. Mikrokumavky pomocí destičky přemístíme z místnosti pre- PCR k termocykleru. Pro amplifikaci použijeme následující rozložení teplot:

#### PCR teplotní program pro amplifikaci 5'UTR regionu *SLC6A4*

proces	teplota	doba	počet cyklů
počáteční denaturace	95°C	10min	1
denaturace	95°C	30sec	30
hybridizace primerů	57°C	90sec	
elongace	72°C	90sec	
dokončení PCR	72°C	10min	1
konečná teplota	4°C	$\infty$	

Po optimalizaci PCR pro amplifikaci úseku 2. intronu *SLC6A4* jsme mohli použít shodný protokol jak pro namíchání reakce tak pro teplotní program.



Primery použité pro amplifikaci oblasti intronu 2 *SLC6A4*:

Forward: 5'-TGGATTTCCTTCTCTCAGTGATTGG-3'

Reverse: 5'-TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG-3'

Při zavádění PCR reakce jsme naamplifikovaný produkt ověřili pomocí gelové elektroforézy a osekvenováním.

### **Analýza restrikčních fragmentů**

Analýza restrikčních míst je metoda využívaná ke stanovení jednonukleotidových polymorfizmů, založená na schopnosti enzymů nazývaných restrikční endonukleázy, izolovaných z různých mikroorganismů, štěpit při určitých teplotách DNA ve specifických, často palindromatických sekvencích tzv. restrikčních místech.

Analýza polymorfizmu rs25531 (SNP) v 5'UTR regulační oblasti genu se provádí pomocí restrikčního enzymu MspI, který působí na amplifikovanou DNA v místě sekvence 5'-C<sup>^</sup>C G G-3' 3'-G G C<sup>^</sup>C-5' a detekuje záměnu adeninu za guanin. Restrikční enzym MspI rozeznává i případně metylované sekvence, proto je vhodný pro naše účely. Stejně lze použít i izoschizomerní restrikční enzym HpaII, který fungoval při pokusech shodně, ale jeho použití je časově náročnější. Reakci pro restrikční analýzu pomocí enzymu MspI jsme prováděli podle následujícího protokolu:

Protokol na 1 reakci pro vyšetření polymorfizmu rs25531

Fast digest buffer 10x- Fermentas	2 µl
Fast digest MspI- Fermentas (1 µl na 0,2 µg DNA)	1 µl
voda	17 µl
PCR produkt	10 µl

Uvedené chemikálie (mimo PCR produktu) opatrně smícháme a rozpipetujeme do jednotlivých označených mikrozkušavek. Při práci s restrikčním enzymem dbáme na rychlou a opatrnou manipulaci, při níž se snažíme co nejvíce eliminovat vystavení enzymu vyšším teplotám. Nakonec přidáme jednotlivé vzorky ve formě PCR produktu a inkubujeme dle protokolu ve zkumavkovém inkubátoru:

### Protokol inkubace restrikční analýzy

Proces	teplota	doba působení
působení enzymu-restrikce	37,5°C	30-60 min
deaktivace enzymu	60°C	10-30 min

### **Fragmentační analýza**

#### Fragmentační analýza pomocí elektroforézy v agarózovém gelu

Délkový polymorfismus 5-HTTLPR detekujeme pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Vzhledem k očekávané velikosti fragmentů (cca 500pb) a rozdílu mezi dlouhou a krátkou variantou (44pb) volíme gel o koncentraci 2%. Agarózový gel vyrobíme pomocí odvážené práškové agarózy, kterou smícháme s potřebným množstvím 1X TBE pufru (určíme podle počtu gelů). Směs poté za pomoci zahřívání rozpustíme a nalijeme do plexisklové formy. Pomocí plastického hřebenu, vloženého do formy, vytvoříme v agaróze jamky pro nanášení vzorků. Gel necháme tuhnout za pokojové teploty asi 45minut. Ze ztuhlého gelu odstraníme hřeben a vyjmeme celý gel z formy. Hotový agarózový gel můžeme ihned použít, nebo ho lze skladovat ponořený v 1X TBE pufru v chladničce. Gel vložíme do elektroforetické vany zalité dostatečným množstvím 1X TBE pufru. Jednotlivé amplifikované vzorky DNA nejprve smícháme s nanášecím pufrem a přeneseme do jednotlivých jamek v gelu. Do jedné z jamek nanese standardní DNA (DNA ladder o velikosti 100pb). Hodnoty elektrického pole nastavíme podle následujícího protokolu:

#### Protokol pro elektrické pole gelové elektroforézy

Počet vzorků	Proud	napětí	Doba
7	500mA	100V	50min

Vizualizaci vzorků na gelu provedeme pomocí fotografického snímku gelu v UV záření po obarvení v lázni 1% etidumbromidu.

### Fragmentační analýza pomocí kapilární elektroforézy (cELFO)

Analýzu pomocí kapilární elektroforézy na přístroji ABI Prism 3130 Genetic Analyser využíváme při použití fluorescenčně značených primerů v PCR. Výhodou této analýzy je spotřeba menšího množství vzorku a možnost pracovat s nižší koncentrací vzorku nežli u klasické gelové elektroforézy. Při využití celé destičky lze analyzovat 96 vzorků najednou a výsledky lze odečíst v přesnosti na 1 pb. Nevýhodou je finančně větší náročnost na analýzu ve srovnání s gelovou elektroforézou (např. fluorescenčně značené primery), ale časová úspora a přesnost výsledků jsou důvody, proč kapilární elektroforéza nahrazuje v mnoha analýzách elektroforézu gelovou.

Amplifikovanou DNA rozpipetujeme do platíčka spolu s formamidem a standardem podle následujícího protokolu:

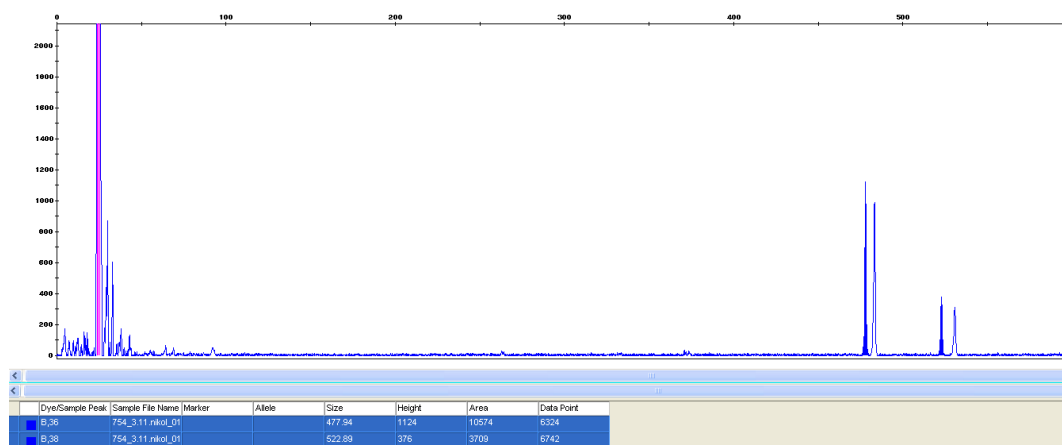
Protokol na 1 reakci fragmentační analýzy pomocí cELFO

Formamid	9 $\mu$ l
GeneScan™-500 ROX™ Size Standard	0,5 $\mu$ l
Amplifikovaná DNA	1,1 $\mu$ l

Uvedené chemikálie vyjma DNA smícháme a rozpipetujeme do jednotlivých jamek destičky a poté přidáme jednotlivé vzorky DNA. Podle souřadnic jednotlivých jamek si vytvoříme legendu vzorků, kterou následně využijeme při zadávání analýzy.

Vyhodnocení i analýza probíhají v kapilárním analyzátoru podle zadaného příslušného programu. Výsledky zobrazené na obrázku 3 odečteme pomocí programu Gene Mapper.

Obrázek 3. Zobrazení výsledků pomocí programu Gene Mapper



Haplotyp S/L 5-HTTLPR

## **Sekvenování DNA**

V našem experimentu jsme ověřili správnost amplifikace produktů po PCR. Po klasické PCR reakci je třeba produkt přečistit pomocí komerční sady QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen). Po přečištění se produkt opět amplifikuje pomocí sekvenační PCR. Tato sekvenační PCR se provádí pouze s jedním primerem za použití následujícího protokolu:

Protokol sekvenační PCR na 1 reakci

BigDye Terminator	2 $\mu$ l
Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Přečištěný PCR produkt	4 $\mu$ l

Uvedené chemikálie postupně rozpipetujeme do označených zkumavek, jednu reakci vždy pro jeden z primerů (pro reverse a forward primer připravíme reakci zvlášť). Reakce přeneseme z pre-PCR místnosti do post-PCR, kde přidáme přečištěný PCR produkt.

Amplifikujeme pomocí přednastaveného speciálního sekvenačního programu (sekv.pcr) v termocykleru Perkin Elmer.

Vzniklý produkt před analýzou přečistíme pomocí ethanolové precipitace a po odsátí supernatantu eluujeme ve formamidu.

Pomocí sekvenačního programu analyzujeme takto připravený vzorek v kapilárním analyzátoru ABI Prism 3130 Genetic Analyser a výsledek vyhodnotíme pomocí programu Sequencing Analysis 5.3.

## 4 Výsledky

Pro statistické zpracování byly vybrány jen ty vzorky, u kterých byly výsledky analýz kompletní. Vzorky, u kterých neproběhla restriční analýza nebo analýzy pro stanovení intronových variant, nebyly zahrnuty do výsledného statistického souboru.

Pro rozložení variant v jednotlivých skupinách a jejich významnost byl vypočten Chí kvadrát.

Následující tabulka podává přehled o počtech vzorků v jednotlivých skupinách. Vzhledem ke špatné kvalitě vzorků a slabé koncentraci novorozeneckých vzorků musela být řada vzorků, u kterých neproběhly kompletní analýzy, vyřazena.

Tabulka 4 shrnuje počty kompletních vzorků u jednotlivých skupin.

Tabulka 4. Počty vzorků v jednotlivých skupinách

		pohlaví		celkem
		žena	muž	
		počet	počet	počet
SKUPINA	middle	76	50	126
	newborn	11	27	38
	old	49	48	97

### *Vysvětlivky*

Old – skupina 1- staří lidé

Middle – skupina 2- reprodukční věk

Newborn – skupina 3- novorozenci

Vzhledem k tomu, že nebyl shledán rozdíl v rozložení alel mezi skupinami starých osob – „ambulatory“ a „non-ambulatory“, nejsou zde proto tyto analýzy prezentovány. Skupina starých lidí je tak zahrnuta pouze jako celek „old“.

## 4.1 Dvojalelické rozlišení

Následující tabulka 5 prezentuje haplotypy v jednotlivých skupinách dle dvojalelického rozlišení.

2\_Haplotype – dvojalelické rozlišení: SS, SL, LL

Tabulka 5. Zastoupení variant v jednotlivých skupinách

2_HAPLOTYPE				
		LL	SL	SS
		Count	Count	Count
GROUP	middle	35	64	27
	newborn	13	23	2
	old	41	40	16

Tabulka 6 uvádí procentuální zastoupení alel dvojalelického systému.

U skupiny starých lidí můžeme pozorovat vyšší zastoupení L alely oproti dvěma kontrolním skupinám. Haplotype L/L převažuje narozdíl od haplotypu S/L pouze ve skupině starých lidí. Kontrolní výsledky skupin 2 a 3 odpovídají předpokládanému rozložení alel s nejvyšším zastoupením haplotypu S/L, následujícím L/L a nejnižším zastoupením haplotypu S/S.

Tabulka 6. Procentuální zastoupení

2_HAPLOTYPE				
		LL	SL	SS
GROUP	newborn	34,2%	60,5%	5,3%
	middle	27,8%	50,8%	21,4%
	old	42,3%	41,2%	16,5%

Statistickou významnost dat dvojalelického systému uvádí tabulka 7.

Tabulka 7. Výpočet chí kvadrátu pro dvojalelické rozložení v jednotlivých skupinách

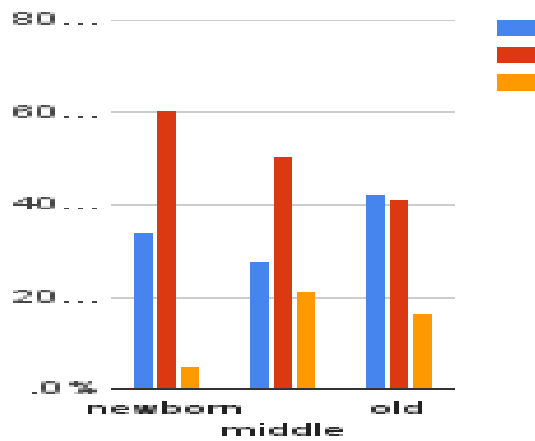
Pearson Chi-Square Tests		
2_HAPLOTYPE		
GROUP	Chi-square	10,166
	df	4
	Sig.	,038*

Chi kvadrát menší než 0,05 – je významné, tzn. rozložení sledovaných znaků ve skupinách není shodné.

V tomto případě je rozdíl v rozložení statisticky významný.

Graf 1 dále zobrazuje haplotypy dvojelelického rozložení v jednotlivých skupinách. Z grafického zobrazení výsledků vyplývá vyšší výskyt haplotypu LL ve skupině „old“ oproti ostatním skupinám.

Graf 1. Zastoupení haplotypů v jednotlivých skupinách u dvojelelického rozlišení



*Legenda grafu:*

Osa y: procenta

Označení vzorků: modrá- L/L, červená- S/L, oranžová- S/S

## 4.2 Trojalelické rozlišení

Následující tabulka 8 prezentuje rozložení alel v jednotlivých skupinách dle trojalelického rozdělení. Toto rozdělení zpřesňuje posouzení transkripční účinnosti jednotlivých alel v pořadí, ve kterém jsou v následujícím výpisu uvedeny, od nejvyšší transkripční účinnosti po nejnižší.

3\_Haplotype – trojalelické rozlišení: LaLa, LaLg, LaSa, LgLg, SaLa, SaLg, SaSa

Tabulka 8. Zastoupení variant v jednotlivých skupinách

3_HAPLOTYPE							
		LaLa	LaLg	LgLg	SaLa	SaLg	SaSa
		Count	Count	Count	Count	Count	Count
GROUP	middle	28	6	1	59	6	26
	newborn	9	4	0	21	2	2
	old	30	12	0	38	1	16

Percentuální zastoupení haplotypů v jednotlivých skupinách při rozlišení trojalelickým systémem je shrnuto v tabulce 9.

Tabulka 9. Percentuální zastoupení

3_HAPLOTYPE							
		LaLa	LaLg	LgLg	SaLa	SaLg	SaSa
GROUP	newborn	23,7%	10,5%	,0%	55,3%	5,3%	5,3%
	middle	22,2%	4,8%	,8%	46,8%	4,8%	20,6%
	old	30,9%	12,4%	,0%	39,2%	1,0%	16,5%

Statistickou významnost dat trojalelického systému uvádí tabulka 10.

Tabulka 10. Výpočet chí kvadrátu pro trojalelické rozložení v jednotlivých skupinách

Pearson Chi-Square Tests		
		3_HAPLOTYPE
GROUP	Chi-square	16,223
	df	12
	Sig.	,181a,b

Chi kvadrát menší než 0,05 – je významné, tzn. rozložení sledovaných znaků ve skupinách není shodné. V tomto případě tedy rozdíl rozložení není významný.

Z tabulky 9 vyplývá vyšší výskyt haplotypu La/La ve skupině „old“, nicméně rozložení není statisticky významné.



### 4.3 Intron 2

Tabulka 11 reprezentuje rozložení alel polymorfizmu STin2 druhého intronu v jednotlivých skupinách.

Podstatná je především alela 9, vykazující nejvyšší transkripční účinnost genu.

Tabulka 11. Zastoupení variant v jednotlivých skupinách

INTR_HAPOLOTYE							
		10-10	10-12	12-12	9-10	9-12	9-9
		Count	Count	Count	Count	Count	Count
GROUP	middle	36	8	6	13	35	28
	newborn	15	0	0	13	1	9
	old	31	9	8	21	21	7

Percentuální zastoupení haplotypů v jednotlivých skupinách intronu je shrnuto v tabulce 12.

Tabulka 12. Percentuální zastoupení

INTR_HAPOLOTYE							
		10-10	10-12	12-12	9-10	9-12	9-9
GROUP	newborn	39,5%	,0%	,0%	34,2%	2,6%	23,7%
	middle	28,6%	6,3%	4,8%	10,3%	27,8%	22,2%
	old	32,0%	9,3%	8,2%	21,6%	21,6%	7,2%

Statistickou významnost dat polymorfizmu STin2 uvádí tabulka 13.

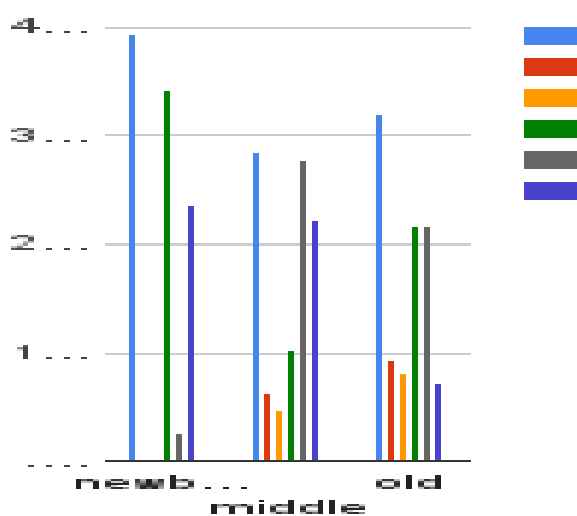
Tabulka 13. Výpočet chí kvadrátu pro rozložení intronových variant v jednotlivých skupinách

Pearson Chi-Square Tests		
		INTR_HAPOLOTYE
GROUP	Chi-square	35,763
	df	10
	Sig.	,000*

Chi kvadrát menší než 0,05 – je významné, tzn. rozložení sledovaných znaků ve skupinách není shodné. V tomto případě je rozdíl v rozložení statisticky významný.

Graf 2 zobrazuje rozložení výsledků u jednotlivých skupin při analýze haplotypů polymorfizmu STin2 ve druhém intronu *SLC6A4*. Z grafického zobrazení vyplývá, že haplotypy 10/12 a 12/12 se vyskytují nejvíce u skupiny starých lidí, naproti tomu ve skupině novorozenců nebyl ani jeden z těchto haplotypů nalezen. Haplotyp 9/9 se naopak ve skupině starých lidí vyskytuje nejméně.

Graf 2. Rozložení intronových variant v jednotlivých skupinách



Legenda grafu:

Osa y: procenta

Označení vzorků: světle modrá- 10/10, červená- 10/12, oranžová- 12/12, zelená- 9/10, tmavě zelená- 9/12, tmavě modrá-9/9

I když jsou získané výsledky o počtu jednotlivých haplotypů polymorfizmu STin2 druhého intronu statisticky významné, je jejich interpretace pomocí porovnání skupiny starých lidí s kontrolními skupinami v souvislosti s předešlými výsledky poněkud nejasná.

Ve větší míře se u skupiny starých lidí vyskytují haplotypy 12/12 a 10/12, naopak haplotyp 9/9 v nižší míře. To přináší v ohledu na transkripční účinnost genu opačný výsledek, nežli jsme pozorovali u dvojalelického systému rozdělení polymorfizmu 5-HTTLPR (viz graf 1).

## 5 Diskuze

V našem experimentu jsme zhodnotili výskyt polymorfizmu serotoninového transportéru u tří věkově rozdílných skupin za účelem potvrzení výskytu vyšší frekvence určitého haplotypu ve skupině starých lidí, dosahujících nadprůměrného dožitého věku. Skupiny byly složeny z rovnoměrně zastoupených pohlaví a jediným kritériem pro výběr vzorků DNA byl věk. Skupiny lidí středního věku a novorozenců fakticky sloužily jako kontroly oproti hlavní skupině starých lidí, u kterých jsme chtěli potvrdit vliv konkrétního zastoupení alel genu pro serotoninový transportér se specifickou účinností transkripce v širokém kontextu ovlivňující predispozice k mnohým psychiatrickým onemocněním, majícím v důsledku jistý vliv i na kvalitu života a ovlivňující délku dožitého věku. Přes původní plán studie, vyšetřit co největší počet vzorků u jednotlivých skupin, jsme byli nuceni konečný počet analyzovaných vzorků snížit s ohledem na výslednou sumu vzorků, u kterých jsme dospěli ke kompletním výsledkům všech molekulárně genetických vyšetření. Dané výsledky byly redukovány kvůli nižší koncentraci vyizolované DNA (hlavně v případě novorozeneckých vzorků izolovaných z krevních skvrn) a dále pak i nízkou kvalitou či degradací DNA některých vzorků starých lidí, způsobenou dlouhodobým skladováním.

Skupinu starých lidí jsme dále rozdělili podle elementárního posouzení zdravotního stavu v době odběru krve pro získání DNA na kategorie ambulatory a non-ambulatory pro případné porovnání zastoupení jednotlivých alel polymorfizmu *SLC6A4*. Toto rozdělení podle zdravotního stavu na pacienty odkázané na dlouhodobou a pravidelnou léčebnou péči a ostatní- bez potřeby speciální lékařské péče nicméně nepřineslo žádné statisticky významné rozdíly, a proto byly v dalších analýzách tyto kategorie zpětně sjednoceny a hodnoceny pouze jako skupina starých lidí. Důvodem pro neinterpretovatelný rozdíl skupin ambulatory a non- ambulatory může být omezení množstvím vyšetřených vzorků, ale i vynechání hodnocení vlivu konkrétního pohlaví u jednotlivých haplotypů, které hraje v některých psychiatrických onemocněních roli jako faktor náchylnosti k onemocnění nebo nepřesná a neúplná diagnóza u rozdělování vyšetřovaných osob do konkrétní kategorie.

Z vyšetřovaných 3 systémů polymorfizmů byly shledány statisticky významné pouze 2 a jejich výsledky zde budou komentovány.

Náš experiment vychází ze základních poznatků o funkci serotoninu jako neurotransmiteru, ovlivňujícího modulaci mnohých biologických i behaviorálních

funkcí lidského těla zahrnujících například apetit, lokomoční aktivitu, hormonální sekreci, či spánek. Podstatnou funkcí serotoninu je i modulace nálad a kolísání v jeho metabolismu či přímo jeho dlouhodobý nedostatek vede ke změnám nálad, depresivním stavům a podrážděnosti (Jacobs & Azmitia 1992).

Rozdílná transkripční účinnost genu pro serotoninový transportér *SLC6A4* se stala podstatou mnoha asociačních studií psychiatrických onemocnění, zvažujících roli výskytu konkrétní alely tohoto genu s definovanou mírou transkripční účinnosti se zvýšenou náchylností k danému onemocnění. Tyto studie ovšem nejsou založeny na jednotně vyšší či nižší transkripční účinnosti alel genu *5-HTT*. Experimenty naopak vykazují u různých psychiatrických onemocnění zvýšený výskyt jak alel s nižší, tak i s vyšší efektivitou transkripce. Nabízí se tedy otázka možnosti hodnocení výskytu určitého haplotypu genu pro serotoninový transportér jako zvýhodňujícího, či naopak. Předpokládali jsme ale, že určitý kladný vliv konkrétního haplotypu by se mohl projevit právě zvýšeným výskytem ve skupině starých lidí.

Polymorfizmy genu *5-HTT*, zejména *5-HTTLPR*, *rs25531* a *STin2* se staly hlavním předmětem zájmu výzkumu genetického vlivu u mnohých psychiatrických poruch a jejich role jak v náchylnosti k onemocnění, tak i ve vážnosti průběhu, či reakcích na léčbu byly potvrzeny v mnoha asociačních studiích výzkumných středisek celého světa. Tabulka 14 shrnuje některé z asociačních studií.

Nejvíce studovaným polymorfizmem je délkový polymorfismus *5-HTTLPR* nacházející se v 5'UTR regulační oblasti genu. Dlouhá varianta genu tzv. L alela je spojována například se sebevražděným chováním (Gaysina et al. 2006), melancholickými depresemi (Baune et al. 2008) a z fyziologických onemocnění, například s plicní hypertenzí (Eddahibi et al. 2001). Dále je L varianta v některých případech spojována s vyšší mírou agresivity (Hessl et al. 2008), nebo s vyšší náchylností k závislosti na kouření (Kremer et al. 2005). Na druhé straně se ale v mnoha studiích potvrzuje L alela jako ochranný faktor vůči náchylnosti k hlavní depresivní poruše, bipolární afektivní poruše, neuroticismu, či k poruchám příjmu potravy. Protektivní charakter L alely byl potvrzen i v případě náchylnosti ke schizofrenii nebo k rozvinutí závislosti na alkoholu.

Již z výše uvedeného vyplývá jistá nesourodost vlivu konkrétní varianty genu *5-HTT* na zdravotní stav. V ohledu na povahu psychiatrických onemocnění a jejich složité

v mnoha případech dodnes ne zcela objasněné příčině vzniku je genetické pozadí pouze jednou z přispívajících složek. Avšak čím více je v tomto ohledu sledována role serotoninového transportéru, tím více se potvrzuje původní hypotéza o silném vlivu tohoto genu na utváření genetického faktoru v oblasti psychiatrie. Hlavním nedostatkem asociačních studií je kromě výzkumu malého počtu vzorků i omezení výzkumu na samotný délkový polymorfismus. Z literatury vyplývá, že i SNP, konkrétně rs25531 nacházející se v lokusu 5-HTTLPR ovlivňuje transkripční účinnost L alely genu srovnatelně s S alelou. Nabízí se tedy rozdělení tohoto polymorfismu na trojalelický systém, ve kterém vzhledem k transkripční účinnosti genu rozlišujeme varianty L, S a Lg (Hu et al. 2006).

Další překážkou pro studium polymorfismu serotoninového transportéru jsou geografické rozdíly v zastoupení jednotlivých alel. Lesh et al. (1996) uvádí rozložení alel polymorfismu 5-HTTLPR v populaci následovně: 32% L/L, 49% L/S, a 19% S/S. Naproti tomu ale například studie v asijské populaci Gerretsen & Pollock (2008) uvádějí převažující výskyt S alely nad L alelou.

Podstatou porovnání tří věkově rozdílných skupin bylo statisticky prokázat odlišný výskyt určité varianty genu pro serotoninový transportér u skupiny lidí dosahujících nadprůměrného dožitého věku a dále určit kontrolní procentuální rozložení alel polymorfismu pro serotoninový transportér v kontrolních skupinách náhodně vybraných vzorků z jednotného regionu ČR.

Zastoupení jednotlivých alel polymorfismu 5-HTTLPR v kontrolních skupinách vyšlo následovně: 31% L/L, 56%L/S a 13%SS. Tento výsledek se mnoho neliší od výsledku uvedené studie Leshe et al. (1996).

V naší studii prokázala analýza vzorků při dvojalelickém rozdělení alel polymorfismu 5-HTTLPR u skupiny 1 vyšší výskyt haplotypu L/L charakteristického nejvyšší transkripční účinností.

Pokud vezmeme v úvahu první přirozenou selekci lidí z této skupiny v důsledku situace během jejich života před zavedením moderní léčebné péče od roku 1950 a dále protektivní charakter L alely v případě depresivních onemocnění, neuroticismu, poruchám příjmu potravy či závislosti na alkoholu, mohli bychom zhodnotit haplotyp L/L jako faktor podílející se na vyšší šanci dosažení nadprůměrného dožitého věku.

Psychický stav lidí se prokazatelně v určité míře odráží i na stavu fyzickém. Právě náchylnost k depresivním stavům může u mnohých interních onemocnění působit negativně na celkový zdravotní stav. Například u pacientů s chronickým onemocněním srdce, nesoucích S alelu 5-HTTLPR je pozorována vyšší náchylnost k depresi, zvýšené vnímání stresu a vysoká sekrece noradrenalinu. Tyto faktory mohou u těchto pacientů přispívat např. ke zhoršení kardiovaskulárních funkcí (Otte et al. 2007). Zvýšená citlivost k depresivním stavům po vystavení stresujícím životním událostem a tzv. akutní úbytek tryptofanu (ATD) jsou popisovány v asociaci s výskytem S alely (Firk & Markus 2009). L/L haplotyp tedy přispívá k lepšímu zvládnutí stresových situací a k ochraně před propuknutím depresivních stavů. Další pozitivní působení L alely a to konkrétně v pokročilém věku potvrzuje studie, která u pacientů s depresivní poruchou ve věku nad 65 let nesoucích S alelu 5-HTTLPR prokázala v porovnání s pacienty nesoucími obě alely L méně účinnou léčbu pomocí SSRI. Pacienti nesoucí krátkou verzi genu zažili více závažných nežádoucích účinků během průběhu studia a jejich léčba byla více přerušovaná. Denní dávky léčiv musely být nižší nežli u ostatních pacientů nesoucích dlouhou variantu genu (Murphy et al. 2004).

Tento vliv se v jisté, i když malé míře podílí i na rozvoji sebevražedných sklonnů, vyplývajících často právě z depresivních stavů a ačkoliv se studie samotného sebevražedného chování rozcházejí Bondy et al. (2000) ve své studii na německé populaci uvádí zvýšený výskyt haplotypů S/L a S/S polymorfizmu 5-HTTLPR u obětí sebevražd oproti kontrolním vzorkům zdravých lidí.

Diskutovat lze i nad závislostí na kouření. Přítomnost L alely byla vyšetřena u lidí závislých na tabákových výrobcích více nežli alela S (Kremer et al. 2005), (Hu et al. 2000) ale naproti tomu ve své studii popisuje větší potíže se snahou přestat kouřit a možný výskyt neuroticismu s tím spojený u nositelů S alely.

Tabulka 14. Původní tabulka z literárního přehledu se zvýrazněnými asociacemi 5-HTTLPR.

Asociace	Pohlaví	Haplotyp	Transkripční účinnost
Deprese	♀♂	S/-	-
	♀	S/-	-
Melancholická deprese	♀	L/L	+
	♀	La/La	+
BAP	♀♂	12/-	-
	♀♂	S/-	-
Sebevražedné chování	♀	L/L	+
	♀♂	S/-	-
Poruchy příjmu potravy	♀♂	S/-	-
Neuroticismus	♀♂	S/-	-
Schizofrenie	♀♂	12/-	-
Závislost na alkoholu	♀♂	S/S	-
	♂	S/-	-
	♀	S/L	=
Závislost na nikotinu	♀♂	L/L	+
	♀♂	12/12	-
	♀♂	S/-	-
Plicní hypertenze	♀♂	L/L	+

Z literárních podkladů tedy nemůžeme stanovit jednoznačně pozitivní vliv haplotypu L/L 5-HTTLPR, nicméně ve spojení s našimi výsledky se můžeme přiklonit k hypotéze o protektivním charakteru dlouhé varianty regulační oblasti genu pro serotoninový transportér, který ve spojení s dalšími genetickými a enviromentálními vlivy může přispívat ke zvýšení šance na dosažení nadprůměrného dožitého věku.

U analýzy trojalelického systému rozdělení alel polymorfizmu 5-HTTLPR jsme v numerických výsledcích u skupiny starých lidí stanovili zvýšený výskyt haplotypu La/La. Tyto výsledky ovšem nevykazují statistickou významnost a je tedy vhodné uvažovat o zopakování vyšetření tohoto polymorfizmu pro získání významných dat. Pokud by byl potvrzen zvýšený výskyt haplotypu La/La u skupiny starých lidí, mohli bychom definovat vyšší transkripční účinnost genu pro serotoninový transportér a konkrétní alely spojené s tímto efektem jako faktor podílející se na zvýšení šance dosažení nadprůměrného dožitého věku.

Nevypovídající povaha vyšetření alel trojalelického systému 5-HTTLPR navíc silně omezuje možnost využití vypovídajících výsledků získaných vyšetřením alel u dvojalelického systému. Jak již bylo uvedeno, jednonukleotidová záměna adeninu za guanin ovlivní transkripční účinnost L alely v takové míře, že ji lze srovnat s S alelou, a změnit tak skupinu homozygotů L/L na heterozygoty La(S)/L, a skupinu heterozygotů S/L na homozygoty La(S)/S.

Přítomnost alely STin2.9 s nejvyšší transkripční účinností byla prokázána především u kontrolních skupin, naproti téměř polovičnímu zastoupení u skupiny starých lidí. Tento výsledek jednoznačně nekoreluje s výsledky analýzy výskytu alely L 5-HTTLPR, taktéž s nejvyšší efektivitou transkripční účinnosti. Jedinou asociační studií která by korelovala s naším pozorováním je experiment Ogilvie et al. (1996), který popisuje zvýšený výskyt alely STin2.9 u pacientů postižených afektivní poruchou oproti kontrolním skupinám.

Nejvíce zastoupené haplotypy u skupiny starých lidí jsou 10/12 a 12/12. Haplotyp 12/12 patří k nejzmiňovanějším v asociačních studiích. Asociační studie jsou shrnuty v tabulce 15.

Cho et al. (2005) pomocí srovnávací studie potvrdil vliv polymorfizmu STin2 na výskyt BAP, i když výsledky této studie ukazují, že vliv je minoritní, u sledovaných pacientů byla oproti kontrolám zjištěna zvýšená přítomnost alely STin2.12. Asociaci polymorfizmu v intronu 2 serotoninového transportéru s kouřením popsal Kremer et al. (2005). Haplotyp 12/12 u STin2 byl častěji přítomen u osob závislých na kouření, oproti nekuřákům, avšak při studiu intenzity závislosti nebyly objeveny žádné asociace. Fan & Sklar (2005) podle rozsáhlé studie označují variantu Stin2.12 v 2. intronu genu pro serotoninový transportér jako jeden z rizikových faktorů náchylnosti k rozvoji schizofrenie.



Tabulka 15. Tabulka z literárního přehledu se zvýrazněnými asociacemi STin2.

Asociace	Pohlaví	Haplotyp	Transkripční účinnost
Deprese	♀♂	S/-	-
	♀	S/-	-
Melancholická deprese	♀	L/L	+
	♀	La/La	+
BAP	♀♂	9/-	+
	♀♂	12/-	-
	♀♂	S/-	-
Sebevražedné chování	♀	L/L	+
	♀♂	S/-	-
Poruchy příjmu potravy	♀♂	S/-	-
Neuroticismus	♀♂	S/-	-
Schizofrenie	♀♂	12/-	-
Závislost na alkoholu	♀♂	S/S	-
	♂	S/-	-
	♀	S/L	=
Závislost na nikotinu	♀♂	L/L	+
	♀♂	12/12	-
	♀♂	S/-	-
Plicní hypertenze	♀♂	L/L	+

Protektivní charakter alely STin2.10 prokázán ve studii neuroticismu (Kazantseva et al. 2008), není uveden v tabulce pro svůj charakter výskytu u zdravých pacientů oproti kontrolám (nemocných).

Vyšetřením 3 věkově odlišných skupin z obdobného geografického regionu jsme získali data vykazující určitou odlišnost v zastoupení jednotlivých alel genu pro serotoninový transportér. V literatuře nebylo prozatím popsáno žádné pozorování typu zmnožení třínukleotidových repetitiv a podobně, které by naše výsledky mohlo částečně vysvětlovat. Bylo ovšem popsáno mnoho asociačních studií, které přes svá omezení přináší informace o charakterech jednotlivých alel ve vlivu na rozvoj psychiatrických onemocnění. Skupina starých lidí byla charakterizována vyšší frekvencí alely vykazující větší efektivitu v transkripční účinnosti oproti ostatním alelám. To by mohlo být považováno za jeden z faktorů podílejících se na zvýšení šance dosažení nadprůměrného dožitého věku. K podpoření této hypotézy by ale bylo zapotřebí vyšetřit větší počet vzorků jednotlivých skupin a zanalizovat výsledky v systému širšího trojalelického rozdělení, které fakticky ovlivňuje a mění frekvence rozdělení dvojelelického. V dalších výzkumech je třeba zaměřit se na vylepšení molekulárně genetických analýz, zejména na izolaci DNA z krevních skvrn a na stanovování polymorfismu STin 2 pomocí kapilární elektroforézy. Dále by bylo vhodné současně provést či zhodnotit dostupné studie týkající se polymorfismů pro serotoninové receptory.

## 6 Závěr

Serotoninový transportér (5-HTT) hraje důležitou roli v serotonergní neurotransmisí. Na základě neurochemické a fyziologické role serotoninu je právě gen pro serotoninový transportér zásadním kandidátním genem pro řadu onemocnění. Tento gen a jeho polymorfizmy stojí v popředí výzkumu genetického vlivu na psychiatrická onemocnění, jako jsou deprese, neuroticismus, schizofrenie či závislost na návykových látkách.

Cílem naší studie bylo vyšetřit tři nejstudovanější polymorfizmy genu *SLC6A4* ve třech věkově odlišných skupinách a případně stanovit specifické zastoupení alel ve skupině starých lidí dosahujících nadprůměrného dožitého věku oproti kontrolní skupině novorozenců a lidí středního věku. Polymorfizmy byly vybrány na základě existence velkého množství asociačních studií, ve kterých jsou jednotlivé alely charakterizovány jak svou rozdílnou transkripční účinností, tak specifickým výskytem u mnohých psychiatrických onemocnění. Přes velký počet studií v literatuře ale chybí souhrnné informace, v jakých případech může hrát polymorfismus v genu pro serotoninový transportér zásadní roli. Délkový polymorfismus 5-HTTLPR, nacházející se v 5'UTR regulační oblasti genu, tvořený inzercí/delecí 44 párů bazí se vyskytuje v dlouhé- L a krátké- S formě, vykazující zhruba poloviční transkripční účinnost oproti alele L.

S alela je spojována s horší reakcí na traumatizující události či na vystavení stresovým situacím. Lidé nesoucí S alelu jsou náchylnější k propuknutí depresivních a úzkostných stavů, sebevražedným sklonům nebo alkoholismu. L alela je naproti tomu své nositele vystavuje vyšší náchylnosti k závislosti na nikotinu, vyšší míře agresivity, či k plicní hypertenzi. Toto dvojleické rozdělení bylo krátce po svém objevení doplněno o další polymorfismus ve stejné oblasti, způsobující změnu transkripční účinnosti L alely přibližně na úroveň alely S. Tento polymorfismus rs25531 rozšiřuje polymorfismus 5-HTTLPR na trojalelický systém alel Lg, La a S. Tento systém nicméně vyšetřuje pouze zlomek popsanych asociačních studií a je tedy třeba vnímat jejich výsledky jako neúplné. Poslední z vyšetřovaných polymorfizmů se nachází v oblasti intronu 2 a je tvořen variantním počtem tandemových repetit a to konkrétně opakováním sekvence 17 bazí 9krát, 10krát a 12krát, přičemž alela tvořena 9 kopiemi vykazuje nejvyšší transkripční účinnost genu. Tento polymorfismus je označován STin2.

Výsledkem naší studie je nalezení vyšší frekvence haplotypu L/L u skupiny starých lidí, oproti kontrolám. Toto zjištění ovšem nelze zpřesnit trojalelickým systémem rozdělení, neboť výsledky tohoto polymorfizmu neprokázaly statistickou významnost. Stanovení frekvence alel pro STin 2 přineslo vzhledem k transkripční účinnosti alel opačný výsledek. U skupiny starých lidí byla s nejvyšší frekvencí zastoupena alela STin2.12, s nejnižší alela STin2.9.

## 7 Souhrn

Serotoninový transportér, kódovaný genem SLC6A4 velkou mírou ovlivňuje serotonergní transmisi. Efektivita transkripce tohoto genu je specifická pro konkrétní variantu, v jaké je gen přítomen. Tyto varianty na úrovni polymorfizmů jsou často sledovány v asociačních studiích psychiatrických onemocnění.

Konkrétně se jedná o inzerci či delecí 44pb v regulační 5'UTR části genu kdy v případě inserce hovoříme o tzv. L (z angl. Long) alele a v případě delece o tzv. S (z angl. Short) alele. Dále o jednonukleotidovou záměnu, taktéž v oblasti 5'UTR genu, která při záměně adeninu za guanin způsobí u L alely snížení transkripční účinnosti a v neposlední řadě polymorfismus ve druhém intronu genu tzv. STin2, který je tvořen tandemovými repeticemi o 9, 10 a 12 počtech opakování. Rozdílná transkripční účinnost jednotlivých alel je tedy faktorem modulace serotonergního systému a konkrétní zastoupení haplotypů může ovlivnit náchylnost pacientů k psychiatrickým poruchám jako jsou například deprese, neuroticismus, bipolární porucha nebo závislost na návykových látkách. Objasnění příčiny vzniku mnohých psychiatrických chorob prozatím nebylo zcela prokázáno, avšak asociační studie serotoninového transportéru přinášejí zajímavé výsledky ohledně genetického vlivu na rozvoj těchto onemocnění.

V naší studii jsme zhodnotili zastoupení jednotlivých alel genu pro serotoninový transportér u třech věkově rozdílných skupin. Skupina starých lidí byla sestavena ze vzorků DNA pocházejících od lidí starších 75 let. Zbylé dvě skupiny byly zastoupeny vzorky lidí středního (reprodukčního) věku a vzorky novorozenců.

Analýzu vzorků jednotlivých skupin jsme prováděli na úrovni dvojeleického rozdělení, tedy na alely L a S, dále na úrovni trojeleického rozdělení na alely La, Lg a S a také na úrovni intronových variant, konkrétně STin2.9, STin2.10 a STin2.11.

Podařilo se nám definovat statisticky významný rozdíl v zastoupení haplotypu L/L u skupiny starých lidí oproti kontrolním skupinám. Avšak toto zjištění jsme kvůli statisticky nevýznamným výsledkům nemohli potvrdit u rozdělení podle trojeleického systému.

Ačkoliv se nám podařilo najít haplotyp se specificky zvýšeným výskytem u studovaného vzorku populace s předpokládaným výskytem selekčně výhodných alel, je toto zjištění do velké míry omezeno neinterpretovatelností výsledků při rozdělení na trojeleický systém.

## 8 Seznam literatury

Allen, N.C., Bagade, S., McQueen, M.B., Ioannidis, J.P.A., Kavvoura, F.K., Khoury, M.J., Tanzi, R.E., Bertram, L. (2008): Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nature Genet.* 40: 827-834.

Anguelova, M., Benkelfat, C., Turecki, G. (2003): A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Molec. Psychiat.* 8(7): 646–653.

Ansorge, M.S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., Gingrich, J.A. (2004): Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306: 879-881.

Baune, B.T., Hohoff, C., Mortensen, L.S., Deckert, J, Arolt, V, Domschke, K. (2008): Serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) association with melancholic depression: a female specific effect? *Depress. Anxiety.* 25(11): 920-5.

Bienvenu, T., Chelly, J. (2006): Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nature Rev. Genet.* 7: 415-426.

Bondy, B., Erfurth, A., de J., Kruger, M., Meyer, H. (2000): Possible association of the short allele of the serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) with violent suicide. *Molec. Psychiat.* 5: 193–195.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. (2003): Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301: 386-389.

De Bona, C., Zappella, M., Hayek, G., Meloni, I., Vitelli, F., Bruttini, M., Cusano, R., Loffredo, P., Longo, I., Renieri, A. (2000): Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Europ. J. Hum. Genet.* 8: 325-330.

Di Bella, D.D., Catalano, M., Cavallini, M.C., Riboldi, C., Bellodi, L. (2000): Serotonin transporter linked polymorphic region in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Molec. Psychiat.* 5: 233–234.

Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Pirelli, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M., Belmaker, R.H. (1996): Dopamine D4 receptor exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nature Genet.* 12: 78-80.

Eddahibi, S., Humbert, M., Fadel, E., Raffestin, B., Darmon, M., Capron, F., Simonneau, G., Darteville, P., Hamon, M., Adnot, S. (2001): Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 108: 1141-1150.

Eddahibi, S., Chaouat, A., Morrell, N., Fadel, E., Fuhrman, C., Bugnet, A.S., Dartevelle, P., Housset, B., Hamon, M., Weitzenblum, E., Adnot, S. (2003): Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 108: 1839-1844.

Fan, J.B., Sklar, P. (2005): Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Molec. Psychiat.* 10: 928-938.

Feinn, R., Nellissery, M., Kranzler, H.R. (2005): Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 133B: 79-84.

Firk, C., Markus, C.C. (2009): Differential effects of 5-HTTLPR genotypes on mood, memory, and attention bias following acute tryptophan depletion and stress exposure. *Psychopharmacology*. 203(4): 805-818.

Fumeron, F., Betoulle, D., Aubert, R., Herbeth, B., Siest, G., Rigaud, D. (2001): Association of a functional 5-HT transporter gene polymorphism with anorexia nervosa and food intake. *Molec. Psychiat.* 6(1): 9-10.

Gaysina, D., Zainullina, A., Gabdulhakov, R., Khusnutdinova, E. (2006): The serotonin transporter gene: Polymorphism and haplotype analysis in russian suicide attempters. *Neuropsychobiology*. 54: 70-74.

Gerra, G., Garofano, L., Zaimovic, A., Moi, G., Branchi, B., Bussandri, M., Brambilla, F., Donnini, C. (2005): Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 135B: 73-78.

Gerretsen, P., Pollock, B.G., (2008): Pharmacogenetics and the serotonin transporter in late-life depression. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4(12): 1465-1478.

Gorwood, P. (2004): Eating disorders, serotonin transporter polymorphisms and potential treatment response. *Am. J. Pharmacogenomics*. 4: 9-17

Grabe, H.J., Lange, M., Wolff, B., Volzke, H., Lucht, M., Freyberger, H.J., John, U., Cascorbi, I. (2005): Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. *Molec. Psychiat.* 10: 220-224.

Grice, D.E., Halmi, K.A., Fichter, M.M., Strober, M., Woodside, D.B., Treasure, J.T., Kaplan, A.S., Magistretti, P.J., Goldman, D., Bulik, C.M., Kaye, W.H., Berrettini, W.H. (2002): Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 787-792.

Hagerman, P.J., Hagerman, R.J. (2004): The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 805-816.

- Hammen, C., Brennan, P.A., Keenan-Miller, D., Hazel N.A., Najman J.M. (2010): Chronic and acute stress, gender, and serotonin transporter gene-environment interactions predicting depression symptoms in youth. *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 51(2): 180-7.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Seemann, M., Bengel, D., Balling, U., Riederer, P., Lesch, K. P. (1995): Functional promoter and polyadenylation site mapping of the human serotonin (5-HT) transporter gene. *J. Neural Transm.* 102: 247-254.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P. (1996): Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66: 2621-2624.
- Herman, A.I., Philbeck, J.W., Vasilopoulos, N.L., Depetrillo, P.B. (2003): Serotonin transporter promoter polymorphism and differences in alcohol consumption behaviour in a college student population. *Alcohol Alcohol.* 38: 446-449.
- Hessl, D., Tassone, F., Cordeiro, L., Koldewyn, K., McCormick, C., Green, C., Wegelin, J., Yuhas, J., Hagerman, R.J.: (2008) Brief report: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X syndrome - moderating secondary genes in a "single gene" disorder. *J. Autism. Dev. Disord.* (38): 184–189.
- Hu, S., Brody, C.L., Fisher, C., Gunzerath, L., Nelson, M.L., Sabol, S.Z., Sirota, L.A., Marcus, S.E., Greenberg, B.D., Murphy, D.L., Hamer, D.H. (2000): Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Molec. Psychiat.* 5(2): 181–188.
- Hu, X.Z., Lipsky, R.H., Zhu, G., Akhtar, L.A., Taubman, J., Greenberg, B.D., Xu, K., Arnold, P.D., Richter, M.A., Kennedy, J.L., Murphy, D.L., Goldman, D. (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 78: 815-826.
- Huang, W., Ma, J.Z., Payne, T.J., Beuten, J., Dupont, R.T., Li, M.D. (2008): Significant association of DRD1 with nicotine dependence. *Hum. Genet.* 123: 133-140.
- Cho, H.J., Meira-Lima, I., Cordeiro, Q., Michelon, L., Sham, P., Vallada, H., Collier, D.A. (2005): Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molec. Psychiat.* 10: 771-781.
- Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. (1992): Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72: 165–229.
- Kazantseva, A.V., Gaysina, D.A., Faskhutdinova, G.G., Noskova, T., Malykh, S.B., Khusnutdinova, E.K. (2008): Polymorphisms of the serotonin transporter gene (5-HTTLPR, A/G SNP in 5-HTTLPR, and STin2 VNTR) and their relation to personality traits in healthy individuals from Russia. *Psych. Genet.* 18: 167-176.



- Kendler, K.S., Prescott, C.A., Myers, J., Neale, M.C. (2003): The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch. Gen. Psychiatry.* 60: 929-937.
- Kotler, M., Manor, I., Sever, Y., Eisenberg, J., Cohen, H., Ebstein, R.P., Tyano, S. (2000): Failure to replicate an excess of the long dopamine D4 exon III repeat polymorphism in ADHD in a family-based study. *Am. J. Med. Genet.* 96: 278-281.
- Kremer, I., Bachner-Melman, R., Reshef, A., Broude, L., Nemanov, L., Gritsenko, I., Heresco-Levy, U., Elizur, Y., Ebstein, R.P. (2005): Association of the serotonin transporter gene with smoking behavior. *Am. J. Psychiatry.* 162: 924-930.
- Kustanovich, V., Ishii, J., Crawford, L., Yang, M., McGough, J.J., McCracken, J.T., Smalley, S.L., Nelson, S.F. (2004): Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Molec. Psychiat.* 9: 711-717.
- Landman, N., Jeong, S.Y., Shin, S.Y., Voronov, S.V., Serban, G., Kang, M.S., Park, M.K., Di Paolo, G., Chung, S., Kim, T.W. (2006): Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 19524-19529.
- Lasky-Su, J.A., Faraone, S.V., Glatt, S.J., Tsuang, M.T. (2005): Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)* 133B: 110-115.
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L. (1996): Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-1530.
- Li, M.D., Ma, J.Z., Beuten, J. (2004): Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behaviour. *Clin. Genet.* 66: 382-392.
- Lohmueller, K.E., Pearce, C.L., Pike, M., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N. (2003): Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nature Genet.* 33: 177-182.
- Lopez Leon, S., Croes, E.A., Sayed-Tabatabaei, F.A., Claes, S., Van Broeckhoven, C., van Duijn, C.M. (2005): The dopamine D4 receptor gene 48-base-pair-repeat polymorphism and mood disorders: a meta-analysis. *Biol. Psychiat.* 57: 999-1003.
- Lowe, N., Kirley, A., Hawi, Z., Sham, P., Wickham, H., Kratochvil, C.J., Smith, S.D., Lee, S.Y., Levy, F., Kent, L., Middle, F., Rohde, L.A., and 20 others (2004): Joint analysis of the DRD5 marker concludes association with attention-deficit/hyperactivity disorder confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 348-356.

- MacKenzie, A., Quinn, J. (1999): A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 15251-15255.
- MacLean, M.R., Deuchar, G.A., Hicks, M.N., Morecroft, I., Shen, S., Sheward, J., Colston, J., Loughlin, L., Nilsen, M., Dempsey, Y., Harmar, A. (2004): Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 109: 2150-2155.
- Mann, J.J., Huang, Y., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Oppenheim, S., Kelly, T.M., Dwork, A.J., Arango, V. (2000): A Serotonin Transporter Gene Promoter Polymorphism (5-HTTLPR) and Prefrontal Cortical Binding in Major Depression and Suicide. *Arch. Gen. Psychiatry*. 57: 729-738.
- Matsushita, S., Suzuki, K., Murayama, M., Nishiguchi, N., Hishimoto, A., Takeda, A., Shirakawa, O., Higuchi, S. (2004): Serotonin transporter regulatory region polymorphism is associated with anorexia nervosa. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)* 128B: 114–117.
- Mattson, M.P., Maudsley, S., Martin, B. (2004): A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res. Rev.* 3: 445–464.
- McMahon, F.J., Simpson, S.G., McInnis, M.G., Badner, J.A., MacKinnon, D.F., DePaulo, J.R. (2001): Linkage of bipolar disorder to chromosome 18q and the validity of bipolar II disorder. *Arch. Gen. Psychiat.* 58: 1025-1031.
- McNab, F., Varrone, A., Farde, L., Jucaite, A., Bystritsky, P., Forssberg, H., Klingberg, T. (2009): Changes in cortical dopamine D1 receptor binding associated with cognitive training. *Science* 323: 800-802.
- Mrazek, D.A., Rush, A.J., Biernacka, J.M., O'Kane, D.J., Cunningham, J.M., Wieben, E.D., Schaid, D.J., Drews, M.S., Courson, V.L., Snyder, K.A., Black, J.L., III, Weinshilboum, R.M. (2009): SLC6A4 variation and citalopram response. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)* 150B: 341–351.
- Munafò, M.R., Lingford-Hughes, A.R., Johnstone, E.C., Walton, R.T. (2005): Association between the serotonin transporter gene and alcohol consumption in social drinkers. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)* 135B: 10-14.
- Muramatsu, T., Higuchi, S., Murayama, M., Matsushita, S., Hayashida, M. (1996): Association between alcoholism and the dopamine D4 receptor gene. *J. Med. Genet.* 33: 113-115.
- Murphy, G.M., Jr., Hollander, S.B., Rodrigues, H.E., Kremer, C., Schatzberg, A.F. (2004): Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch. Gen. Psychiat.* 61: 1163-1169.

Ogilvie, A.D., Battersby, S., Bubb, V.J., Fink, G., Harmar, A.J., Goodwin, G.M., Smith, C.A.D. (1996): Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 347: 731-733.

Otte, Ch., McCaffery, J., Ali, S., Whooley, M.A. (2007): Association of a serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) with depression, perceived stress, and norepinephrine in patients with coronary disease: The heart and soul study. *Am. J. Psychiatry*. 164(9): 1379–1384.

Ozaki, N., Goldman, D., Kaye, W.H., Plotnicov, K., Greenberg, B.D., Lappalainen, J., Rudnick, G., Murphy, D.L. (2003): Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Molec. Psychiat.* 8: 933-936.

Pack, S. (2009): Poor physical health and mortality in patients with schizophrenia. *Nurs. Stand.* 23(21): 41-45.

Placzek, M.R., Misbahuddin, A., Chaudhuri, K.R., Wood, N.W., Bhatia, K.P., Warner, T.T. (2001): Cervical dystonia is associated with a polymorphism in the dopamine (D5) receptor gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 71: 262-264.

Ryu, V., Jon, D.I., Cho, H.S., Kim, S.J., Lee, E., Kim, E.J., Seok, J.H. (2010): Initial depressive episodes affect the risk of suicide attempts in Korean patients with bipolar disorder. *Yonsei Med. J.* 51(5): 641-647.

Schindler, K.M., Pato, M.T., Dourado, A., Macedo, A., Azevedo, M.H., Kennedy, J.L., Pato, C.N. (2002): Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population. *Molec. Psychiat.* 7: 1002-1005.

Smits, K.M., Smits, L.J.M., Schouten, J.S.A.G., Stelma, F.F., Nelemans, P., Prins, M.H. (2004): Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Molec. Psychiat.* 9: 433-441.

Tabakoff, B., Saba, L., Printz, M., Flodman, P., Hodgkinson, C., Goldman, D., Koob, G., Richardson, H.N., Kechris, K., Bell, R.L., Hübner, N., Heinig, M., Pravenec, M., Mangion, J., Legault, L., Dongier, M., Conigrave, K.M., Whitfield, J.B., Saunders, J., Grant, B., Hoffman, P.L. WHO/ISBRA Study on State and Trait Markers of Alcoholism. (2009): Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans. *BMC Biology*. 7: 70.

Thomson, P.A., Wray, N.R., Thomson, A.M., Dunbar, D.R., Grassie, M.A., Condie, A., Walker, M.T., Smith, D.J., Pulford, D.J., Muir, W., Blackwood, D.H.R., Porteous, D.J. (2005): Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, and X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Molec. Psychiat.* 10: 470-478.

Usiello, A., Baik, J.H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V., Borrelli, E. (2000): Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408: 199-203.

Vandenberg, D.J., Persico, A.M., Uhl, G.R. (1992): A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs. *Molec. Brain Res.* 15: 161-166.

Yu, Y.W.Y., Tsai, S.J., Chen, T.J., Lin, C.H., Hong, C.J. (2002): Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *Molec. Psychiat.* 7: 1115-1119.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. Text Revision. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 2000.

<http://www.emea.europa.eu>