

**Studium polymorfismů v kandidátních genech v populaci
ADHD dětí**

Mgr. Marta Kopečková

Ústav biologie a lékařské genetiky UK - 2. LF a FN Motol,
Praha

2007

Školitel: Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.

OBSAH:

Poděkování.....	4
Zkratky.....	5
1. Teoretický úvod.....	7
1.1. ADHD, diagnostická kritéria a klíčové symptomy.....	7
1.2. Komorbidity	8
1.3. Modely ADHD	9
1.4. Neuroanatomie.....	10
1.5. Neurochemie – transmitterové systémy.....	11
1.5.1. Neurotransmitery.....	11
1.5.2. Dopaminergní systém	11
1.5.3. Serotoninový systém	13
1.5.4. Noradrenergní systém	13
1.6. Genetika a molekulární genetika.....	14
1.6.1. DNA polymorfismy.....	15
1.6.2. Dopaminové receptory.....	17
1.6.2.1. DRD2	19
1.6.2.2. DRD3	20
1.6.3. Monoaminové transportéry.....	21
1.6.3.1. DAT1.....	21
1.6.3.2. 5-HTT.....	23
1.6.4. Enzymy.....	24
1.6.4.1. DBH.....	25
2. Cíle práce.....	28
2.1. Pracovní hypotéza a význam práce.....	28
2.2. Konkrétní cíle práce.....	29
3. Materiál a metody	30
3.1. Soubor pacientů.....	30
3.2. Izolace DNA.....	30
3.3. VNTR a RFLP analýza.....	31
3.4. Statistická analýza alelických asociačních studií.....	33
3.4.1. Sledování HWE v kontrolní skupině.....	33
3.4.2. Vlastní výpočty – univariátní model.....	35
4. Výsledky.....	37
4.1. Databáze.....	37
4.2. VNTR analýza.....	37
4.3. RFLP analýza.....	38
4.4. Výsledky molekulárně-genetické analýzy.....	40
4.5. Statistická analýza alelických asociačních studií.....	41
4.5.1. Kontingenční tabulky pro jednotlivé polymorfismy.....	41
4.5.2. Sledování HWE v kontrolní skupině.....	42
4.5.3. Výpočet podílu nadějí a 95 % konfidenčního intervalu.....	43
4.5.4. Korekce na multifunkční model.....	50
4.5.5. Korekce na pohlaví.....	51
4.5.6. Haplotapová analýza.....	51
5. Diskuse.....	54
6. Závěr.....	60

7. Literatura.....	61
8. Přílohy.....	71
8.1. Publikace.....	71

PODĚKOVÁNÍ.

Práce byla prováděna v laboratořích molekulární genetiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol. Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. MUDr. Petru Goetzovi, CSc. a přednostovi ÚBLG Prof. MUDr. Milanu Mackovi, DrSc. za umožnění postgraduálního studia na ÚBLG a podporu při práci. Také bych ráda poděkovala vedoucí Oddělení lékařské molekulární genetiky MUDr. Anně Křepelové, CSc. za cenné rady a připomínky, Ing. Arpádu Bódayovi za odborné vedení během prvních dvou let práce a Prof. Ing. Zdeňku Sedláčkovi, DrSc. za obětavou pomoc při psaní práce, jeho cenné rady a ochotu pomoci.

Dále děkuji Jance Rýdlové a Veronice Rádsetoulalové za přípravu velmi kvalitní a čisté DNA, své kolegyni a kamarádce Mgr. Gabriele Čalounové za mnoho cenných diskuzí a podporu při řešení problémů a také ostatním kolegyním Mgr. Zuzaně Mušové, Mgr. Kristýně Pavlíkové, RNDr. Petře Hedvičákové, Lídě Apltové, Mgr. Šárce Bendové, Kateřině Horké a Mgr. Petru Vasovčákovi za příjemnou atmosféru ve skvělém kolektivu.

Pacienti a klinická data byla získána v laskavé spolupráci s Psychiatrickou klinikou UK 1.LF. Především bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Ivo Pacltovi, Csc. za odborné vedení a obětavou pomoc během celého postgraduálního studia, za pomoc při psaní rigorózní práce a též za jeho lidský přístup k problematice i studentům. Také děkuji MUDr. Dagmar Pacltové za pomoc při sestavování souboru kontrol. Poděkování bych ráda vyjádřila i pracovníkům škol, kteří nám umožnili získat vzorky slin, samotným dětem i jejich rodičům, kteří s výzkumem souhlasili.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za stálou podporu.

Práce byla finančně podporována z výzkumného záměru 6111.

ZKRATKY.

5-HIAA	- 5-hydroxyindoloctová kyselina
5-HT	- serotonin
5-HTT	- gen pro serotoninový transportér
AA	- arachidonová kyselina
AAAD	- dekarboxyláza aromatických L-aminokyselin
AC	- adenylát cykláza
ADRA2	- adrenergní receptor A2
ADHD	- Attention-deficit Hyperactivity Disorder
ATP (ADP, AMP)	- adenosintrifosfát (adenosindifosfát, adenosinmonofosfát)
cDNA	- komplementární deoxyribonukleotidová kyselina
C.I. 95%	- konfidenční interval
CEU	- European ancestry
COMT	- katechol-O-metyltransferáza
CSF	- cerebrospinální tekutina
D (1-5)	- dopaminový receptor (1-5)
DA	- dopamin
DAT1	- dopaminový transportér
DBH	- dopamin-beta-hydroxyláza
DOPA	- dihydroxyfenylalanin
DOPAC	- 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
DRD (1-5)	- gen pro dopaminový receptor (1-5)
DSM-IV	- The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition
EEG	- elektroencefalografie
GABA	- kyselina γ -aminobutyrová
h^2	- heritabilita
HTR1B	- 5-hydroxytryptaminový (serotoninový) receptor 1B
HVA	- homovanilová kyselina
HWE	- Hardy-Weinberg equilibrium
ICD-10	- The International Classification of Diseases, 10th edition
K ₃ EDTA	- draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
LD	- linkage disequilibrium
MAO	- monoaminoxidáza
MDD	- Major Depressive Disorder
MHPG	- 3-methoxy-4-hydroxyfenylglycol
MKN-10	- Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize
MRI	- Magnetic Resonance Imaging
NA	- noradrenalin
NET	- noradrenalinový transportér
O.R.	- odds ratio, podíl nadějí
PAA	- fenyloctová kyselina
PCR	- polymerase chain reaction
PET	- pozitronová emisní tomografie
PLC	- fosfolipáza C
RFLP	- restriction fragment length polymorphism
SERT	- serotoninový transportér
SLA6A	- skupina monoaminových kotransportérů
SNAP25	- synaptosomálně-asociovaný protein

SNP	- single nucleotide polymorphism
STR	- short tandem repeat
TH	- tyrozinhydroxyláza
TM	- transmembránová doména
UTR	- untranslated region
VNTR	- variable number of tandem repeat

1. Teoretický úvod

1.1. ADHD, diagnostická kritéria a klíčové symptomy

Porucha pozornosti / hyperkinetický syndrom (Attention-deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) je jedním z nejčastěji se vyskytujících mentálních onemocnění u dětí. Odhady prevalence se liší dle diagnostických kritérií. V současné době jsou více používána méně přísná a mnohem širěji definovaná kritéria The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV), vydaná Americkou asociací psychiatrů v roce 1994, podle nichž je postiženo 3-6% dětské populace. Také většina mezinárodních výzkumných prací, a zejména většina studií velkých a dobře navržených projektů z mnoha různých pracovišť, se provádí u pacientů, kteří vyhovují podmínkám kritérií DSM-IV. Podle klasifikačního systému The International Classification of Diseases, 10 th edition (ICD-10), u nás známého jako Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize (MKN-10), který je přísnější a odhaduje 0,5% postižených dětí, je opakovaně diagnostikována menší skupina dětí se závažnějšími příznaky než v případě klasifikace DSM-IV. Ačkoliv se vedou polemiky o tom, že diagnostická kritéria DSM-IV jsou příliš benevolentní, existují důkazy, že děti, které splňují tyto podmínky, mají značný prospěch z léčby, a proto by také tuto adekvátní léčbu měly dostat (Munden et Arcelus, 2002). Onemocnění se častěji vyskytuje u chlapců než u dívek v poměru 3 (a více):1 (Poeta et Roso, 2004; Ford et al., 2003; Anderson et al., 1987). Některé studie uvádějí poměr chlapců až 10:1 (Biederman et al., 2002).

Klíčové symptomy ADHD jsou impulzivita, hyperaktivita a nepozornost (podrobněji viz tabulka č.1). Tyto symptomy se projevují již v raných stádiích vývoje a jsou v čase nápadně stálé. Klíčové symptomy a vzorce chování zůstávají v průběhu měsíců i let neměnné. U některých pacientů přetrvávají až do dospělosti (přibližně u 40-50%) (Paclt a Koudelová, 1997), i když s věkem a sociálním zráním ustupují do pozadí. Nicméně mohou narušovat vztahy dítěte s rodinou, jeho vrstevníky a zvyšovat tak riziko sociální izolace. Aby byly symptomy ADHD klinicky významné a splňovaly diagnostická kritéria, musí se vyskytovat ve významném počtu a v dostatečném stupni vážně postihovat schopnosti daného jedince. Rovněž se musí vyskytovat v rozsahu, který překračuje meze běžné pro jedince daného věku a vývojového stadia.

Nepozornost	<ul style="list-style-type: none"> • potíže s udržením pozornosti (např. při práci, při hře) • chyby z nedbalosti • potíže se sledováním instrukcí • potíže s dokončením zadaného úkolu • dezorganizace činnosti • vyhýbání se duševní práci • nezáměr o důležité detaily • zapomnětlivost • roztržitost
Impulzivita	<ul style="list-style-type: none"> • kvapné odpovědi dřív než byla dovslovena otázka • problém vyčkat na určitý okamžik • přerušování jiných (např. skákání do řeči)
Hyperaktivita	<ul style="list-style-type: none"> • neklidné ruce a nohy, neposednost • vstávání ze svého místa v nevhodných okamžicích (např. utíkání ze židle ve třídě během vyučování) • časté a přehnané lezení, pobíhání, popocházení • hlasité vyrušování • nadměrné mluvení • často jakoby „hnaný motorem“

Tabulka č. 1: Klíčové symptomy ADHD

1.2. Komorbidity

50-80 % dětí s ADHD trpí ještě dalšími komorbiditami (Jensen et al., 1997), nejčastěji poruchou opozičního vzdoru (až 60%), emočními problémy, problémy v oblasti sociálních dovedností (50%), poruchou chování (45%), úzkostí, depresemi (oboje 30%), problémy

se spánkem (Biederman et al., 1991), výjimkou nebývají ani další přidružené zdravotní problémy např. alergie, astma, tiky atd. Rozpoznání komorbidit u psychiatrických onemocnění je extrémně důležité z několika důvodů:

- mohou způsobit falešnou diagnózu a výběr léčby
- mohou ovlivňovat reakci pacienta na léčbu
- mohou být spojené s nežádoucími účinky dané terapie
- ovlivňují prognózu pacienta

Často bylo pozorováno, že lidé s ADHD mají větší sklony k užívání návykových látek (alkohol, nikotin, drogy), mají vyšší sklon stát se na nich psychicky i fyzicky závislími a začínají je užívat dříve než lidé bez ADHD.

Existují další onemocnění a poruchy, která mohou být s ADHD chybně zaměňována, a při vyšetřování dítěte s příznaky hyperaktivity, impulzivity a problémy s pozorností nesmí být opomenuta. Poruchy, které mohou simulovat ADHD, mohou být somatického rázu (poruchy zraku nebo sluchu, záchvaty, následky poranění hlavy, nedostatek spánku, špatná výživa), psychické poruchy (obsedantně-kompulzivní poruchy, Tourettův syndrom, autismus, Aspergerův syndrom, psychotické poruchy, poruchy chování, deprese a jiné emoční poruchy) nebo jako následek vedlejších účinků některých léků či drog (fenobarbital, carbamazepin, alkohol). Děti s ADHD mohou rovněž trpět dalšími psychickými poruchami a je potřebné mít je na paměti při vyšetřování a léčbě, neboť symptomy se mohou navzájem překrývat a ztěžovat tak diagnostiku. Velkou pozornost je třeba věnovat terapii dětí s ADHD a jinými poruchami, neboť léčba jedné poruchy může negativně ovlivnit příznaky jiných poruch.

1.3. Modely ADHD

Modely ADHD vysvětlující příčinu tohoto onemocnění se často překrývají, v současné době existují:

- morfologický: snížený objem mozkové tkáně (šedé i bílé hmoty) ve frontálních oblastech mozku
- neuroanatomický: odchylky od normální architektury neuronových spojení
- neurofyziologický: snížený průtok krve mozkem, nedostatečné okysličování nervových buněk, odchylky v elektrické aktivitě mozku
- psychofyziologický: nedostatečná úroveň bdělosti a pozornosti, potíže se soustředěním, pamětí, učením, poruchy pohybové koordinace, sluchové analýzy a syntézy, neustálý neklid, vývojové poruchy řeči apod.
- neurobiologický: dysfunkce ve frontální a striatální oblasti mozku
- biologický: snížená aktivita dopaminergního, noradrenergního a serotoninergního systému

- genetický: genetická podmíněnost odchylek a dysfunkcí

Je na místě zdůraznit polykauzalitu tohoto onemocnění, a také to, že jakoukoli patologii je třeba vždy posuzovat v rámci celkového kontextu pacienta a prostředí. Genetika, biologie, rodina, škola a společnost jsou faktory, které spolupůsobí ve vzájemné interakci (Mash et al., 1996).

Klíčovým nálezem u ADHD jsou drobné dysfunkce ve frontální a striální oblasti mozku (které zodpovídají za pozornost a za organizaci reakcí na nejrůznější zevní i vnitřní podněty), jež jsou s nejvyšší pravděpodobností dědičné. Podobně klíčový je i nález snížené aktivity katecholergních systémů, konkrétně dopaminergního, noradrenergního a serotoninergního, který je podporován některými nálezy snížené koncentrace metabolitů dopaminu, noradrenalinu a serotoninu na periférii (v séru, event. v moči). Tyto nálezy korespondují se závěry genetického výzkumu (Paclt et al., 1999).

1.4. Neuroanatomie

Výsledky magnetické rezonance (MRI) odhalily, že ve zdravé populaci je objem nucleus caudatus pravé strany větší než nucleus caudatus strany levé, zatímco u osob s ADHD je tato asymetrie obrácená (Castellanos 2002, 1996). Nucleus caudatus je mozkové jádro (uvnitř hemisféry velkého mozku) řídící uvědomělé pohyby. Je součástí striata, což je struktura důležitá při útlumovém efektu na chování a udržení pozornosti. Striatum má důležité spojení s limbickým systémem, který zodpovídá za paměť, řízení emocí a motivace.

Děti s ADHD mají též o něco menší oblasti mozkové tkáně v pravém frontálním laloku (Yeo et al., 2003; Castellanos et al., 2002; Hart, 2001). Hynd et al., 1991 zjistili menší corpus callosum u dětí s ADHD než u dětí, které tuto poruchu neměly. Tento nález byl potvrzen i při dalších studiích (Courvoise et al., 2004; Castellanos et al., 2002; Giedd et al., 1994). Corpus callosum je část mozku spojující pravou a levou hemisféru a umožňující tak integraci informací zpracovaných v obou hemisférách. Snížený objem vykazoval i mozeček (Castellanos et al., 2002; Berquin et al., 1998).

Na záznamech EEG vyšetření byl patrný méně vyzrálý vzorec mozkové elektrické aktivity u dětí s ADHD ve srovnání se stejně starými dětmi bez onemocnění. Po podání stimulancí dětem s ADHD se tyto rozdíly snížily. Děti s ADHD mají též v některých oblastech mozku redukováný průtok krve, především v nucleus caudatus (zejména oblast striata) a frontální oblasti (Silberstein et al., 1998).

Při pozitronové emisní tomografii (PET) byla pozorována snížená metabolická aktivita ve frontálních oblastech mozku u adolescentů postižených ADHD. Jednalo se převážně o pravou hemisféru. Po podání stimulancií se tato relativně nízká metabolická aktivita dočasně zvýšila (Zametkin et al., 1993, 1990). Nižší aktivita byla detekována ve striatu, thalamu a hippocampu (Zametkin et al., 1990).

1.5. Neurochemie - transmitterové systémy

1.5.1. Neurotransmitery

Nervové přenašeče (neurotransmitery) jsou nízkomolekulární chemické látky, uvolňované z nervového zakončení na synapsi. Slouží k přenosu impulsu přes synaptickou štěrbinu a k šíření podráždění (v nervovém systému) nebo k vyvolání určité reakce (stah svalu, sekrece žlázy). V neuronu jsou uchovávány ve vezikulárních váčcích, do nichž jsou ukládány aktivním procesem vyžadujícím energii. Kromě neuromediátoru obsahují váčky s katecholaminy i vysoké koncentrace ATP a protein chromogranin. Váčky obsahující serotonin se poněkud liší - je zde specifický protein, který váže s vysokou afinitou serotonin a neobsahuje ATP. Transmitery jsou vylučovány procesem exocytózy po depolarizaci z presynaptické buňky a difundují synaptickou štěrbinou k membráně postsynaptické buňky, kde se nekovalentně váží na receptory a vyvolávají buněčnou odpověď. Nevyužité či z receptorů uvolněné neurotransmitery jsou navraceny zpět do presynaptického neuronu za pomoci transportérů nebo jsou dále metabolizovány specifickými enzymy v synaptické štěrbině. Dle chemického složení lze mediátory klasifikovat do několika skupin viz. Tab. č.2.

1.5.2. Dopaminergní systém

Dopamin (hydroxytaramin) je monoaminový neurotransmitter syntetizovaný z tyrozinu. V nervovém systému má důležitou roli, působí sympatomimeticky s převažujícím inotropním účinkem. Ovlivňuje též motoriku, pozornost a učení. U pacientů s ADHD bylo zjištěno, že genetický defekt v metabolismu dopaminu vede k hypodopaminergnímu stavu limbického systému a frontální oblasti a dále vede ke kompenzatornímu zvýšení dopaminergní aktivity v bazálních gangliích. Methylfenidát

<i>System</i>	<i>Mediátor</i>	<i>Prekurzory</i>
cholinergní	acetylcholin	cholin+acetylkoenzym A
aminokyselinergní	GABA	glukóza → glutamát
	asparagová kys.	glukóza+glutamin; glutamát
	glutamová kys.	glukóza+glutamin; aspartát
	glycin	serin
	homocystein	cystein→cystin
monoaminergní		
<i>katecholaminy</i>	dopamin	tyrozin→DOPA→dopamin
	noradrenalin	tyrozin→DOPA→dopamin →noradrenalin
	adrenalin	noradrenalin→adrenalin
<i>indolaminy</i>	tryptamin	
	serotonin	tryptofan→5-hydroxytryptofan
<i>jiné odvozené od ak</i>	histamin	histidin
	taurin	cystein→cysteamin
<i>purinergní</i>	adenosin	
	ADP, AMP, ATP	

Tabulka č. 2: Rozdělení neuromediátorů dle chemického složení

inhibuje presynaptický transport dopaminu, zvyšuje tak dopaminergní aktivitu a sekundárně vede ke snížení aktivity v bazálních gangliích a snížení krevního průtoku tamtéž (Ruskin et al., 2003; Comings, 1997; Noble et al., 1997). Okolo 70% dětí a adolescentů s ADHD pozitivně reaguje na stimulancia (Scheres et al., 2003; Spencer et al., 1996).

Abnormálně nízká hladina homovanilové kyseliny HVA (metabolitu vzniklého při odbourávání dopaminu) byla nalezena v CSF dětí s ADHD ve srovnání se zdravými kontrolami (Castellanos et al., 1994; Shaywitz et al., 1977).

Geny významné pro etiopatogenezi ADHD v rámci dopaminergního systému jsou geny dopaminových receptorů DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, DRD5 a dále geny enzymů COMT, MAO a transportéru DAT1 (viz dále).

1.5.3. Serotoninergní systém

Serotonin (5-hydroxytryptamin) je biologicky aktivní látka obsažená v krevních destičkách, v buňkách gastrointestinálního traktu a v menší míře i v centrálním nervovém systému. Obzvláštní význam má jako neurotransmitter, neboť ovlivňuje serotoninergní systém, tvořený soustavou neuronů v prodloužené míše, mostu, středním mozku a mezimozku. Tento systém si udržuje za normálního stavu optimální hladinu serotoninu vlastní syntézou z tryptofanu. Neurony se serotoninovými receptory se vyskytují také v limbickém systému a v některých částech mozkové kůry. Serotonin ovlivňuje úroveň aktivace, spánku, snění, proměn nálady atd. Aktivita serotoninergního systému zůstává s věkem více méně neměnná. Deficit serotoninu je spojován s depresemi, agresivitou a suicidálním chováním. Rovněž u pacientů s Alzheimerovou chorobou dochází k redukci hladiny serotoninu a jeho receptorů (Newhouse et al., 2002; Herrmann et Lanctot, 1997). Vzestup hladiny serotoninu je spojován s anxiétou, obsesivně-kompulzivní poruchou a psychotickými symptomy. U pacientů s ADHD a u jejich rodičů, kteří měli také příznaky hyperkinetické poruchy, bylo zjištěno snížení hladiny serotoninu v séru (Comings et al., 1990; Quist et Kennedy, 2001).

1.5.4. Noradrenergí systém

Noradrenalin (NA) a adrenalin jsou syntetizované stejně jako dopamin z tyrozinu v mozku, tvoří se rovněž ve dřeni nadledvin. NA je secernován při ohrožení (reakce útoku-útek), má výrazný vazokonstrikční účinek, podílí se na regulaci úrovně bdělosti a řadě dalších funkcí. Deficit NA se projevuje depresemi, demencí, sníženou bdělostí a koncentrací. Vzestup noradrenergí aktivity je spojován s anxiétou a agresí. Aktivita noradrenergího systému vzrůstá s věkem s výjimkou pubertálního období (Paclt et al., 2004).

U chlapců s ADHD ve srovnání se zdravými kontrolami byla v několika studiích zjištěna nižší hladina metabolitu vzniklého při odbourávání noradrenalinu (MHPG) v séru a v moči (např. Kusaga et al., 2002; Abe et al., 1994). Yasong et al. 1998 sledovali chlapce s ADHD a nepostížené kontroly a zjišťovali hladiny noradrenalinu a poměr NA/MHPG v séru. Oba tyto parametry byly u hyperkinetických dětí sniženy. U pacientů, kteří pozitivně reagovali na podání stimulancií, byly vyšší hodnoty MHPG než u nonrespondérů. Těž bylo pozorováno, že hladiny noradrenalinu jsou signifikantně nižší u pacientů s výraznými projevy ADHD než u skupiny s mírným stupněm této poruchy (Yasong et al., 1998).

Z genetických markerů podmiňujících aktivitu metabolických změn a hladiny jednotlivých neurotransmiterů v rámci noradrenalinového systému jsou nejvýznamější geny pro dopamin-beta-hydroxylázu (DBH) (viz dále) a adrenergní receptory (především ADRA2).

1.6. Genetika a molekulární genetika

ADHD je multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku a vývoji se podílí větší počet genů. Podíl genetiky v etiologii ADHD byl prokázán následujícími strategiemi:

1. **studiem rodin** – prokázaly zvýšenou prevalenci poruchy u příbuzných probandů s ADHD v porovnání s příbuznými normálních kontrol. U nejbližších příbuzných postižených dětí se ADHD vyskytuje v 10-35% (u matek ve 15-20%, u otců 25-30% u sourozenců ve 32%) (Barkley et al., 1997; Biederman et al., 1990).

2. **studiem dvojčat** – ve větší nebo menší míře shodně prokázaly dědičnost poruchy pozornosti. Konkordance je vyšší u monozygotních v porovnání s dizygotními dvojčaty. Míra konkordance se liší v jednotlivých studiích, ale obecně se pohybuje v rozmezí 50 - 80% u jednovaječných a mezi 0-33% u dvouvaječných dvojčat (Sherman et al., 1997; Gilger et al., 1992).

3. **adoptivními studii** – poukazovaly na zvýšený výskyt dysfunkce pozornosti u biologických rodičů probandů s ADHD v porovnání s nižším výskytem u jejich adoptivních rodičů (Sprich et al., 2000).

Multifaktoriálnímu pojetí problematiky nasvědčuje vysoká prevalence v populaci (3-6%) a konkordance u monozygotních dvojčat (50-80%), ale vymyká se v případě vysokého rizika rekurence u příbuzných prvního stupně (Kirley et al., 2002). Zdá se, že ADHD je komplexní genetické onemocnění s mnoha zúčastněnými geny, přičemž každý z nich se na onemocnění podílí větším či menším efektem (Tannock et al., 1998). Heritabilita u ADHD je menší než 1, přibližně 0,75-0,91 (Levy et al., 1997; Simonoff et al., 1998; Martin et al., 2002), což nasvědčuje tomu, že vnější faktory prostředí mají též vliv na etiologii onemocnění (Kirley et al., 2002). Mezi vnější faktory lze zařadit např. komplikace při porodu, věk matky, užívání návykových látek během těhotenství, sociální postavení rodiny atd. Neurony totiž mají schopnost měnit a přizpůsobovat svá spojení s jinými mozkovými buňkami podle toho, zda pracují, nebo ne. Této vlastnosti se říká "plasticita". Jedná se o vytváření neuronových okruhů, které budou zodpovědné za to, jak bude mozek a chování

dítěte v budoucnu fungovat. Vznik neuronových obvodů v mozku pokračuje až do dvaceti let. Zahrnuje jak geneticky předurčený růst mozkových struktur, tak jemné doladění spojů mezi mozkovými strukturami, které je výsledkem jejich používání či nepoužívání. To je zase výsledkem zkušeností, které dítě ve svém prostředí zažívá. Může se proto stát, že onemocnění, které by za příznivějších podmínek zůstalo latentní, přejde pod vlivem nepříznivých okolností do stavu akutního (Biederman et al., 1991; Faraone et al., 1993).

V současné době je známo více než 30 kandidátních genů, které se mohou podílet na vzniku a vývoji ADHD. Konzistentní výsledky zatím přinesl výzkum pouze některých kandidátních genů (DRD4, DAT1, DRD5, DBH, 5HTT, HTR1B a SNAP25) (Faraone, 2005; Paclt et al., 2005).

Je pravděpodobné, že změny v neurotransmitterových systémech (dopaminergním, noradrenergním, serotoninergním i GABA-ergním) a v jejich relativní rovnováze mohou v různé míře ovlivnit závažnost symptomů ADHD. Tyto změny v CNS zprostředkované neurotransmitery mohou být obecně způsobeny změněnou aktivitou či množstvím receptorů (post- i presynaptických), enzymů (podílejících se na syntéze, odbourávání či přeměně neurotransmiteru) a transportérů (přenos neurotransmiteru do presynaptického receptoru, vkládání do vezikulárních váček atd.). Polymorfismy v genech, které souvisí s těmito systémy, pravděpodobně ovlivňují působení neurotransmiterů v mozku a podmiňují tak změny v citlivé rovnováze mezi nimi (Quist et Kennedy, 2001).

Pro náš výzkum byly vybrány geny systému dopaminergního (receptory DRD2, DRD3 a transportér DAT1), noradrenergního (enzym DBH) a serotoninergního (transportér 5-HTT) u nichž byla provedena molekulárně-genetická analýza 11 polymorfismů (viz tabulka č.3). Při výběru jsme vycházeli jednak ze současných znalostí problematiky získaných z literatury a také z molekulární podstaty onemocnění.

1.6.1. DNA polymorfismy

Polymorfismy jsou varianty určité sekvence v genu s frekvencí polymorfnní alely vyšší než jedno procento v populaci. Polymorfnní místa tvoří přibližně 1 z 1000 bp v náhodně vybraném úseku genomické DNA. Některé polymorfismy mohou mít vliv na aminokyselinové složení výsledného proteinu (nesynonymní) a způsobit tak např. nestabilitu

polymorfismus	lokalizace	refSNP ID	podstata polymorfismu	riziková alela	projevy rizikové alely
DBH C-1021T (RFLP)	-1021 promotor	rs1611115	C>T	-1021T (bez restrikčního místa)	↓ exprese mRNA
DBH 5'-ins/del	-4784-4803 promotor		19bp inzerce/delece	delece	↓ exprese mRNA
DBH G444A (RFLP)	Exon 2	rs1108580	G>A Glu148Glu	444A (Glu148) (bez restrikčního místa)	změna sestřihu → ↓ množství maturované mRNA
DBH G910T (RFLP)	Exon 5	rs4531	G>T Ala304Ser	910T (Ala304) (bez restrikčního místa)	↓ homospecifita enzymu
DBH C1603T (RFLP)	Exon 11	rs6271	C>T Arg535Cys	1603T (Arg535) (bez restrikčního místa)	↓ homospecifita enzymu
DBH C1912T (RFLP)	Exon 12	rs129882	C>T Arg638Cys	1912T (Arg638) (bez restrikčního místa)	↓ stabilita mRNA
DBH TaqI (RFLP)	Intron 5	rs2519152	T>C	TaqI B1 (C) (bez restrikčního místa)	? změna sestřihu
DRD2 TaqI (RFLP)	9,5 kb downstream od 3'-UTR	rs1800497	T>C	TaqI A1 (C) (bez restrikčního místa)	↓ množství mRNA ↓ translace
DRD3 Ser9Gly (RFLP)	Exon 1	rs6280	C>T Ser9Gly	456T (Ser9) (bez restrikčního místa)	↓ afinita k DA
DAT1 (VNTR)	3'-UTR		40bp VNTR	alela 10	↑ exprese mRNA
5-HTT (VNTR)	5'-UTR		20-23bp VNTR	alela 1 (16)	↑ exprese mRNA

Tabulka č. 3: Přehled jednotlivých polymorfismů, jejich lokalizace, označení v SNP databázi, molekulární podstata, rizikové alely a jejich projevy. Šedá: polymorfismy v genu pro dopamin-beta-hydroxylázu.

produktu, změnu specifity či afinity k substrátu atd. Polymorfismy, které toto složení nemění (synonymní), mohou např. měnit expresi genu, způsob či efektivitu sestřihu atd.

Dle molekulární podstaty se rozlišují dva typy polymorfismů, a to RFLP a VNTR. RFLP, polymorfismus délky restrikčních fragmentů, nastává, když změny v sekvenci genomové DNA vedou ke vzniku nebo zániku určitého štěpného místa, které je rozpoznáváno specifickým restrikčním enzymem. Dochází tak ke změně délky restrikčního fragmentu. Fragmenty s rozdílnou délkou tvoří v lokusu kodominantní alely. Příčinou vzniku RFLP může být nejen změna jednotlivých nukleotidů, ale i delece či inzerce nepříliš dlouhého úseku

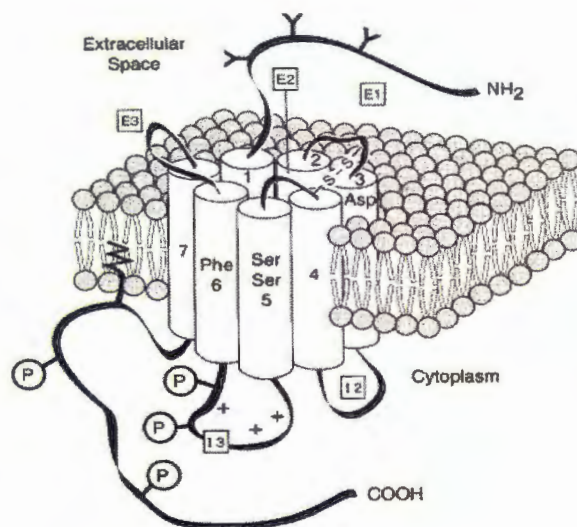
DNA. RFLP způsobené změnou v místě štěpení určitou restriční endonukleázou jsou malou podmnžinou polymorfismů známých jako jednonukleotidové polymorfismy (SNP). SNP jsou o několik řádů častější než VNTR a jsou rozloženy rovnoměrně podél celého genomu. RFLP (a obecně SNP) mají obvykle jen dvě alely odpovídající dvěma různým bázím na určité pozici.

Druhý typ polymorfismu VNTR (variabilní počet tandemových repetice) je vytvořen tandemovým uspořádáním opakujících se krátkých sekvencí DNA. Je charakterizován větší variabilitou, protože počet opakujících se jednotek se může podstatně lišit. Inzerce několika kopií sekvence o délce 10 až 100 bp jsou známy jako minisatelity, ještě častější a polymorfnější jsou mikrosatelity, což jsou úseky DNA tvořené opakováním jednotky o délce dvou-, tří- nebo čtyř nukleotidů. Počet opakování základních nukleotidových jednotek obsažených v jednom mikrosatelitu/minisatelitu se může lišit mezi dvěma homologními chromozómy jednotlivce i mezi jednotlivci v populaci (Nussbaum et al., 2001).

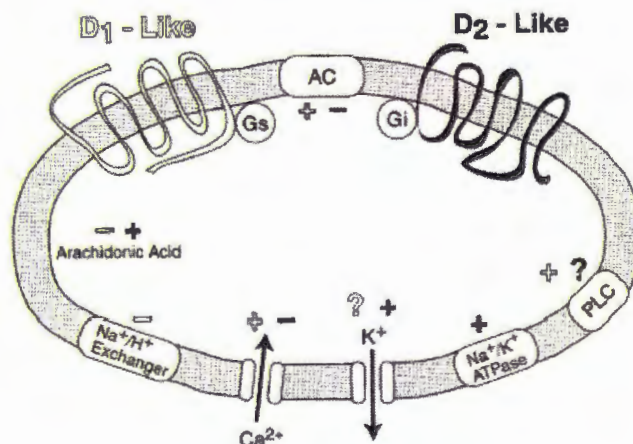
1.6.2. Dopaminové receptory

V případě ADHD jsou převážně sledovány monoaminoergní systémy. Při našem studiu se setkáváme s dopaminovými receptory spřaženými s G-proteiny. V lidské populaci existuje celkem pět typů dopaminových receptorů (D1, D2, D3, D4 a D5). V roce 1978 byly na základě jejich vlastností rozříděny do dvou samostatných skupin: D1-like stimulující adenylát cyklázu (AC) a tvorbu druhých poslů (cAMP) a D2-like inhibující AC a tvorbu cAMP (Spano et al., 1978). D1/D2-like klasifikační pojetí vytvořené koncem 70. let je platné doposud. D1 a D5/D1b receptory jsou klasifikovány jako D1-like a D2, D3 a D4 jako D2-like.

Všechny typy dopaminových receptorů obsahují sedm transmembránových (TM) domén, NH₂-konec orientovaný extracelulárně a intracelulární COOH-konec a všechny interagují s G-proteiny (viz obr. č.1). Příslušníci jedné rodiny sdílejí značnou homologii aminokyselinové sekvence v TM doménách (D2 a D3 receptory ze 75%). V extracelulárních smyčkách 2 a 3 se vyskytují dva cysteinové zbytky (Jackson et Westlind-Danielsson, 1994; O'Down, 1993), které umožňují tvorbu intramolekulárního disulfidického můstku k upevnění receptorové struktury (Fraser 1989; Dohlman et al., 1990). Hustota D1 i D2-like receptorů klesá s věkem (Volkow et al., 1996). Biochemické vlastnosti D1/D2-like receptorů jsou shrnuty níže a na obrázku č.2:



Obrázek č. 1: Struktura D1-like dopaminového receptoru. U D2-like receptorů je 7x kratší COOH-konec a větší 3. intracelulární smyčka. P: místa pro fosforylaci lokalizovaná na 3. intracelulární smyčce (I3) a COOH-konci. Y: Glykosylační místa na NH₂-konci. E1-E3: extracelulární smyčky; 1-7: transmembránové domény; I2-I3: intracelulární smyčky. Obrázek převzat od Missale et al., 1998.



Obrázek č. 2: Signální transdukcce dopaminových receptorů. AC: adenylátcykláza; PLC fosfolipáza C. Obrázek převzat od Missale et al., 1998.

D1-like

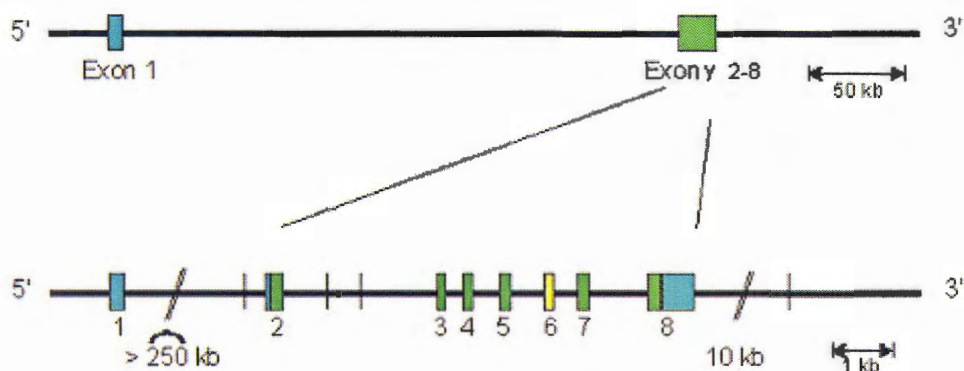
- Geny jsou bez intronů
- Jen postsynaptické receptory
- Párují se s podjednotkou G_s G-proteinu
- Aktivují adenylát cyklázu
- Aktivace Ca₂⁺ kanálů a proudění Ca₂⁺
- Inhibice uvolňování arachidonové kyseliny (AA)

D2-like

- Geny obsahují introny
- Post- i presynaptické receptory
- Párují se s podjednotkou G_i G-proteinu
- Inhibují adenylát cyklázu
- Inhibice proudění Ca₂⁺
- Aktivují K⁺ kanály
- Zvyšují uvolňování AA

1.6.2.1. DRD2

DRD2 gen kóduje dopaminový receptor 415 aminokyselin dlouhý. Je lokalizován na chromozómu 11q22-23 a obsahuje osm exonů v oblasti dlouhé 270 kb. Tato oblast zahrnuje intron 1 přibližně o 250 kb, který odděluje exon 1 od exonů 2-8 kódujících receptorový protein. Exony 2-8 zaujímají pouze 14kb (viz obr. č.3). Transkript podléhá alternativnímu sestřihu exonu 6, což vede ke vzniku dvou typů mRNA. Výsledné translační produkty D2s a D2l se liší o 29 aminokyselin ve třetí intracelulární smyčce (Gandelman et al., 1991). Jelikož tato smyčka sehrává zásadní roli při vazbě ligandu, je pravděpodobné, že se isoformy liší svými vazebnými vlastnostmi. Tento předpoklad byl potvrzen studii (Daltoso 1989; Montmayeur et Borrelli, 1991), při nichž se zjistilo, že obě varianty receptoru inhibují AC, ale D2l isoforma s vyšší efektivitou.



Obrázek č. 3: Struktura DRD2 genu.

Dopaminové receptory D2 jsou především exprimovány ve striatu, ventrálním segmentu a nucleus accumbens. Představují vazebné místo pro mnoho psychoaktivních látek a mohou proto být spojovány s mnoha psychiatrickými a psychickými poruchami. Byly studovány různé genetické polymorfismy v souvislosti např. s Tourettovým syndromem, ADHD, poruchou chování, závislostí na návykových látkách atd.

V případě ADHD je nejčastěji sledován polymorfismus RFLP TaqI (A1/A2) 9,5 kb od 3'-UTR. Comings et al., 1991 vyšetřovali prevalenci alely TaqI A1 a odhalili skutečnost, že genetické varianty lokusu DRD2 mají vliv na impulsivitu, kompulsivitu, personální poruchy, závislé chování a ADHD. Pozorovali též vyšší výskyt alely Taq A1 u pacientů s ADHD než v kontrolní skupině. K obdobným závěrům došli i Šerý et al., 2006 v asociační studii skupiny chlapců s ADHD a chlapců bez ADHD, kde zjistili, že alela A1 a genotyp A1/A1 je v případě

mužských subjektů výrazně asociován s ADHD ($p < 0,008$ resp. $p < 0,002$). Nicméně Rowe et al., 1999 zjistili přesně opačnou asociaci ADHD a alelou A2 a Todd et al., 2002 nepozorovali žádnou signifikantní asociaci mezi DRD2 receptorem a ADHD.

1.6.2.2. DRD3

DRD3 gen lokalizovaný na chromozómu 3q13.3 se skládá ze šesti exonů oddělených pěti introny (v porovnání s DRD2 chybí čtvrtý intron), které umožňují alternativní sestřih. Byly identifikovány ještě další dvě isoformy receptoru DRD3, obě však nefunkční (Giros et al., 1990; Sokoloff et al., 1990). Jedna s transkriptem, který obsahoval v TM3 delecí o velikosti 113bp. Tato delece vede k posunu čtecího rámce a následně ke vzniku předčasného stop kodonu. Vzniká tak protein o velikosti 100 aminokyselin. Druhá varianta receptoru vzniká z mRNA s delecí 54bp mezi TM5 a TM6 (Snyder et al., 1991).

D3 receptory jsou primárně přítomny v nucleus accumbens a předním striatu (Meador-Woodruff et al., 1996; Sokoloff et al., 1990). Při modifikaci DRD3 genu v experimentu na zvířatech byla zjištěna souvislost DRD3 s lokomoční aktivitou (Accili et al., 1996; Ekman et al., 1998). Asociace abnormálních nedobrovolných pohybů s DRD3 byla pozorována i při studiu u lidí (Basile et al., 1999; Steen et al., 1997). Farmakologické pokusy jsou limitovány malou specifitou ligandů pro D3 receptor, avšak při podávání pramipexolu (Boehringer Ingelheim, Německo), jednoho ze specifických agonistů D3 receptoru, byla pozorována u krys snížená lokomoční aktivita (Lagos et al., 1998).

D3 receptor byl opakovaně studován v souvislosti se schizofrenií (např. Kennedy et al., 1995), Parkinsonovým syndromem (Nanko et al., 1994), Tourettovým syndromem (Brett et al., 1993), závislostí na návykových látkách (Krebs et al., 1998) a ADHD (Barr et al., 2000; Pyaton et al., 2001; Muglia et al., 2002; Kirley et al., 2002). V případě ADHD je pozornost zaměřena na polymorfismus Ser9Gly (někdy též BalI/MscI) v exonu 1, způsobující záměnu aminokyseliny Ser>Gly v pozici 9. Tento polymorfismus se ve výsledném proteinu promítá na extracelulárním N-konci. Změněná afinita k ligandům je tak pravděpodobně podmíněna zhoršenou (méně intenzivní) inzercí receptoru do membrány, jako např. v případě receptoru pro rhodopsin, kdy mutace na podobné pozici způsobuje jednu z forem retinis pigmentosa. Receptor s Gly vykazuje signifikantně vyšší afinitu pro dopamin než forma se Ser. Zmíněné studie však neprokázaly, že by DRD3 gen byl významněji asociován s ADHD (O.R. 1,3), nicméně Retz et al., 2003 pozorovali souvislost mezi Ser9Gly a impulzivitou.

1.6.3. Monoaminové transportéry

Monoaminové transportéry jsou lokalizovány transmembránově na presynaptických neuronech převážně v oblastech specifických pro daný neurotransmiterový systém. Jejich funkce spočívá v tom, že „vychytávají“ volné neurotransmitery ze synaptické štěrbině a navracejí je zpět do presynaptického neuronu, z něhož byly původně uvolněny. Zde mohou být znovu zavzaty do vezikulárních váčků a uvolněny při dalším vzruchu. Transportéry tak modulují šíření vzruchu a dobu trvání excitability.

NET, DAT1 i SERT náleží do skupiny monoaminových kotransportérů SLA6A, které jsou spřaženy s Na^+ a Cl^- . Všechny tyto proteiny obsahují dvanáct transmembránových domén, mají intracelulárně orientovaný amino- i karboxy- konec. Homologie jednotlivých TM domén v rámci jedné podrodiny je nejvyšší u TM 1, 2 a 4-8 a nejnižší v oblastech extracelulárních smyček a v amino- a karboxy- koncích (Amara et Kuhar, 1993). Významnou úlohu splňuje druhá extracelulární smyčka, která je nejdelší a obsahuje specifická místa pro glykosylaci, což je důležité v procesu samotného transportu přes membránu a stabilitu vazby ligandu (Melikian et al., 1994, 1996). Na obou proteinových zakončeních a na cytoplazmatických smyčkách jsou lokalizována místa vhodná pro serin, threonin a tyrosin kinázovou fosforylaci, modulující aktivitu transportéru (Ramamoorthy et Blakely, 1999; Chang et al., 2001).

Geny všech těchto transportérů sdílí vysoký stupeň homologie, což nasvědčuje tomu, že vznikly vzájemnou duplikací (Hahn et Blakely, 2002). Kromě exonů obsahují též introny. Alternativní sestřih byl pozorován v genu pro SERT, kde je alternativní sestřihové místo lokalizováno v 5'-UTR a střížné varianty se liší v inzerci/deleci exonu 1B (viz obr. č.4) (Bradley et Blakely, 1997). Všechny geny této rodiny existují v haploidním lidském genomu pouze jako jediná kopie, proto polymorfismy mohou výrazně ovlivňovat funkci transportéru, a to nejrůznějšími způsoby, jelikož zde neexistuje možnost kompenzace produktu z jiného genu. Hustota transportérů predikuje citlivost na neurotransmitery a potažmo na xenobiotika včetně léků.

1.6.3.1. DAT1

Gen pro dopaminový transportér leží na chromozómu 5p13, skládá se z 15 exonů a jeho expesí vzniká transmembránový protein, který je zodpovědný za přenos dopaminu

ze synaptické štěrbině zpět do presynaptického neuronu. Význam genu DAT1 v problematice ADHD souvisí s mechanismem účinku stimulantů. Tyto léky blokují dopaminový přenašeč, inhibují transport dopaminu do presynaptického neuronu a zvyšují tak hladinu dopaminu v synaptické štěrbině (Volkow et al., 1995). Studie na myších prokázaly vyšší míru hyperaktivity u kmene s mutací genu DAT1 vedoucí ke změně funkce transportéru ve srovnání s normální populací zvířat (Giros et al., 1996; Swanson et al., 2000).

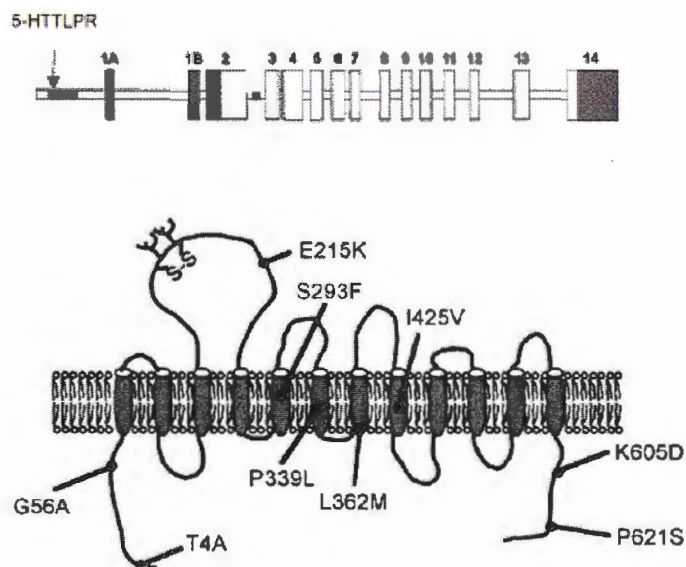
V souvislosti s ADHD je v DAT1 genu nejvíce sledován polymorfismus VNTR 40-bp dlouhého úseku na 3'-UTR. V populaci se nejčastěji vyskytují alely s 10 a 9 opakováními (Sano et al., 1993; Gelernter et al., 1998), méně se 3, 5, 7, 8 a 11 opakujícími se jednotkami (Vanderbergh et al., 1992). Byla nalezena i alela s 13 opakováními (Mitchell et al., 2000). Mezi jednotlivými populacemi existuje vysoká variabilita, např. v populaci severo-, středo- a jihoamerického původu se vyskytuje výhradně alela 10, zatímco u Afričanů a populací východního původu se frekvence této alely pohybuje v rozmezí 0,35-0,50 (Kang et al., 1999).

Zatím není známo, jakým způsobem ovlivňuje tento polymorfismus v nekódující oblasti výsledný protein. 3'-UTR plní několik funkcí: určuje kompartmentaci mRNA v buňce, reguluje rychlost translace a podmiňuje stabilizaci či destabilizaci mRNA. 3'-VNTR tedy pravděpodobně mění transkripční aktivitu nebo stabilitu mRNA. Významnou roli hraje jednak počet opakování, ale také sekvenční varianty v jednotlivých jednotkách. Např. nejčastější alely 9 a 10 se liší v pořadí i druhu motivů (Mill et al., 2005).

Mill et al., 2000 odhalili zvýšenou hladinu mRNA v mozečku a spánkovém laloku, která byla asociována s alelou 10. Skutečnost, že přítomnost alely 10 vede k zesílení transkripční aktivity pozorovali též Michelhaugh et al., 2001 v preparátech získaných ze substantia nigra a Fuke et al., 2001 v COS buňkách. Dougherty et al., 1999; Dresel et al., 2000 a Krause et al., 2000 detekovali nárůst vazebných míst DAT1 ve striatu u pacientů s ADHD o 15-70%, což koreluje s již dříve známým úbytkem dopaminu ve striatální oblasti mozku. Ve dvou z těchto studií počet vazebných míst poklesl po podání stimulantů.

Cook et al., 1995 jako první našli asociaci mezi alelou 10 (480 bp) a ADHD. Asociaci potvrdili též Waldman et al., 1998; Maher et al., 2002; Kahn et al., 2003 a u asijské populace Chen et al., 2003. Nicméně v některých studiích nebyla tato souvislost pozorována (Azherson et al., 1998; Holmes et al., 2000; Roman et al., 2001; Muglia et al., 2002 a Cheuk et al., 2006).

1.6.3.2.2. 5-HTT



Obrázek č. 4: *nahoře*: Struktura 5-HTT genu. Nepřekládané konce znázorněny šedou. Polymorfismus 5-HTTLPR černě. *dole*: Struktura serotoninového transportéru s aminokyselinovými zbytky. Převzato od Hahn et al., 2002.

Gen pro serotoninový transportér je lokalizovaný na chromozómu 17q11.2-q12, skládá se z 15 exonů, avšak pouze 12 z nich je kódujících (viz obr. č.4), a kóduje transmembránový protein přenášející serotonin ze synaptické štěrbině zpět do presynaptického neuronu. Serotoninový transportér je místem, na které se váže celá řada psychostimulujících látek, např. tricyklických antidepresiv, specifických inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu a psychostimulancií, která jsou hojně využívána při léčbě ADHD.

Jedním z často studovaných polymorfismů je polymorfismus v promotorové oblasti genu, přesněji -1212-1255, nazvaný 5-HTTLPR. Jedná se o VNTR 20-23 bp opakujícího se motivu, a to s nejčastějším výskytem alel *l* (long, 16 opakování) a *s* (short, 14 opakování) s frekvencí v indoevropské populaci 0,39 (*l*) a 0,61 (*s*). Velmi vzácně se objevují i alely s 15-, 19-, 20- a 22- opakováními, avšak vždy vázané na konkrétního etnického předka (Delbruck et al., 1997; Gelernter et al., 1997; Kunugi et al., 1997; Michealovsky et al., 1999). Byly též nalezeny i alely *l* a *s*, které se odlišovaly v sekvenci opakujícího se motivu (Nakamura et al., 2000). Heils et al., 1997 pozorovali 3x vyšší transkripční aktivitu v konstruktu obsahujícím promotor s *l* alelou než s alelou *s*. V lymfoblastoidní buněčné linii *ll* genotyp vykazoval vyšší hladinu SERT (Lesch et al., 1996). Zvýšená exprese 5-HTT genu a transportní aktivita proteinu v souvislosti s *ll* genotypem byla pozorována i v dalších periferních tkáních (Eddahibi et al., 2001). Je však třeba opatrné interpretace těchto výsledků v korelaci s

aktivitou SERT v mozku. Například nedávná studie nepříbuzných jedinců funkční zobrazovací metodou neprokázala významný rozdíl ve vazbě radioaktivně značeného ligandu u 5-HTTLPR v některých mozkových oddílech (Willeit et al., 2001). Je ale pravděpodobné, že *l* alela podmiňuje zvýšenou transkripci genu, což vede k vyššímu vychytávání serotoninu a jeho snížené koncentraci v synaptické šterbině.

Alela *l* byla častěji pozorována např. u dětského destruktivního chování, při studiu bipolárních poruch (Mynett-Johnson et al., 2000), MDD, unipolární a bipolární deprese (Furlong et al., 1998; Gutierrez et al., 1998), též u lidí závislých na alkoholu (Thompson et al., 2000; Matsushita et al., 2001), se sebevražednými sklony a impulzivitou (Bondy et al., 2000; Courter et al., 2001). 5-HTTLPR byl studován i v souvislosti s ADHD, konkrétně při různých typech syndromu podle kritérií DSM IV: nepozornost (typ I.), hyperaktivně impulzivní (typ II.) a kombinovaný (typ III.). Byl zjištěn signifikantní pokles *s/s* homozygotů u ADHD typ III oproti kontrolní skupině (10,29% vs 30,88%, $P=0,008$) (Manor et al., 2001). Asociaci *l* alely a ADHD též pozorovali Seeger et al., 2001; Kent et al., 2002; Zoroglu et al., 2002; Beitchman et al., 2003; Currant et al., 2005.

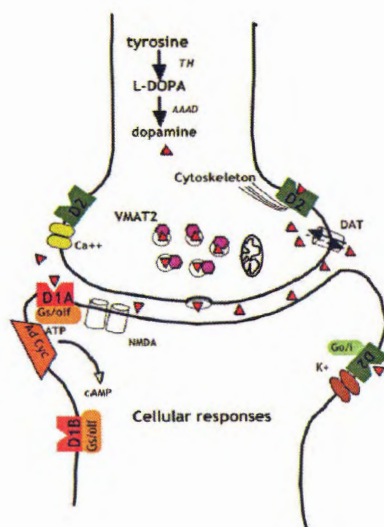
1.6.4. Enzymy

Enzymy se podílejí na syntéze, přeměně a odbourávání neurotransmiterů. Biosyntéza katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu) začíná hydroxylací tyrozinu enzymem tyrozinhydroxylázou (TH). Tento krok je v syntéze limitující. Další enzym dekarboxyláza aromatických L-aminokyselin (AAAD) katalyzuje přeměnu L-DOPA na dopamin. Obě tyto reakce probíhají v cytosolu. Dopamin je potom přenesen do zásobních váček (viz obr. č.5). Váčky v noradrenergických neuronech obsahují enzym dopamin-beta-hydroxylázu, který umožňuje vznik NA. V adrenálních žlázách a v malých skupinách neuronů v mozkovém kmeni se v cytoplazmě nachází enzym fenyletanolamin N-metyltransferáza, který katalyzuje přeměnu noradrenalinu na adrenalin.

Za inaktivaci těchto neuromediátorů jsou primárně odpovědné monoaminoxidáza (MAO) a katechol-O-metyltransferáza (COMT). MAO deaminuje katecholaminy na jejich aldehydy. Je lokalizována na vnější membráně mitochondrií a působí především na volné neuromediátory v presynaptických zakončeních. COMT inaktivuje katecholaminy přenosem metylové skupiny z S-adenosylmethioninu.

Biosyntéza serotoninu (5-HT) začíná hydroxylací L-tryptofanu tryptofanhydroxylázou limitující rychlost syntézy. Tento enzym je v mozku syntetizován pouze v serotoninergních neuronech. Tryptofanhydroxyláza mění tryptofan na 5-hydroxytryptofan a z něj vzniká serotonin působením dekarboxylázy aromatických L-aminokyselin. Primární katabolickou cestou pro 5-HT je deaminace pomocí MAO.

Metabolity monoaminových neuromediátorů z mozku jsou obvykle měřeny v mozkomíšním moku (CSF) a na perifériích. Hlavním metabolitem serotoninu je kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA), dopaminu kyselina homovanilová, ale měří se také kyselina 3,4-dihydroxyfenylactová (DOPAC) a noradrenalinu 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG).



Obrázek č. 5: Syntéza a metabolismus monoaminoergních neurotransmiterů. Popis obrázku v textu.

1.6.4.1. DBH

Dopamin-beta-hydroxyláza (DBH) je enzym, který katalyzuje přeměnu dopaminu na noradrenalin. Vzniklý noradrenalin inhibuje tyrosinhydroxylázu, klíčový enzym v syntéze dopaminu, a tím zpětnovazebně snižuje produkci dopaminu. DBH se v mozku nachází v katecholaminových váčcích na terminálních částech noradrenergických neuronů v šedé kůře (Levis et al., 1992), v nervech sympatického systému a ve dřeni nadledvin, kde se vyskytuje jak v rozpustné formě, tak vázaná na cytoplazmatickou membránu (Weinshilboum, 1978). Gen kódující tento protein je lokalizován na chromozómu 9q34 ve vazbě na lokus AB0 (Craig

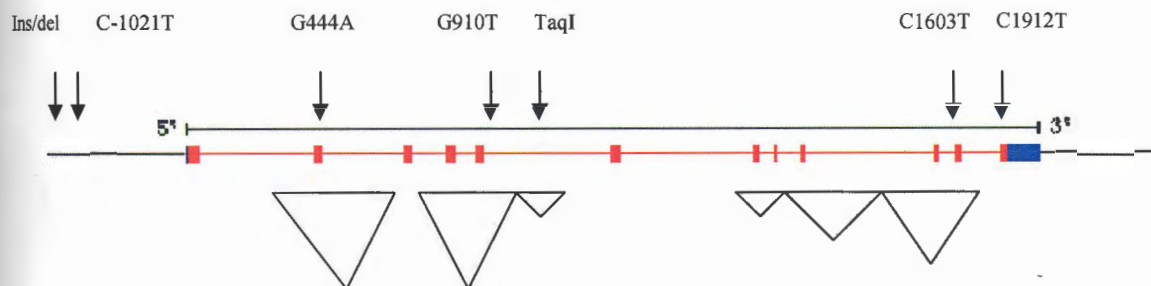
et al., 1988). DBH gen je přibližně 23 kb dlouhý, skládá se z 12 exonů, které kódují 603 aminokyselin dlouhý protein (Kobayashi et al., 1989) a existuje v genomu pouze v jediné kopii.

Dopamin-beta-hydroxyláza je z mozku uvolňována stimulací do krevního řečiště společně s ostatními neurotransmitery a dalšími vezikulárními složkami (Weinshilboum, 1978; O'Connor et al., 1983). Její enzymatická aktivita je měřitelná v plazmě či v CSF (Weinshilboum et Axelrod, 1971) a může sloužit jako indikátor sympatického noradrenergního tonu. Obě hodnoty navzájem korelují a jsou pod významnou genetickou kontrolou s heritabilitou (h^2) 0,98 (hodnota odhadovaná pro DBH v séru) a 0,83 (DBH v CSF) (Oxenstierna et al., 1986). Aktivita DBH v plazmě je velice variabilní dokonce mezi jedinci jedné populace (Weinshilboum et al., 1973).

Aktivita noradrenergního systému vzrůstá s věkem. Paclt et al., 2004 sledovali u dětí vývojové změny aktivity DBH v plazmě v závislosti na věku a pozorovali, že aktivita DBH kontinuálně vzrůstá s výjimkou pubertálního období. Přesněji řečeno, zvyšuje se od 3 do 10 roku, mezi 10 a 14 rokem klesá a mezi 21 a 60 rokem zůstává aktivita DBH v séru více méně neměnná. Obdobný vývojový trend enzymatické aktivity byl pozorován též při výzkumu na krysách (Paclt et al., 2004). V CSF porovnávali vývojové změny DBH aktivity u dětí, adolescentů a dospělých Suzuki et al., 1990 a získali data obdobného rázu s kontinuálním růstem DBH aktivity s výjimkou 10 až 11 roku. Mezi muži a ženami nebyly v tomto směru pozorovány výraznější rozdíly (Weinshilboum et Axelrod, 1971).

U pacientů s hyperkinetickým syndromem byla zaznamenána snížená aktivita DBH v séru a v moči (Bowden et al., 1988; Rogeness et al., 1989a,b; Paclt et al., 1990; Gabel et al., 1993; Galvin et al., 1995, 1997; Comings et al., 1996, 1999; Paclt et al., 1997). Polymorfismy, které mají na tuto skutečnost primární vliv, nejsou zatím známy. Tyto polymorfismy se mohou nacházet jak v kódující oblasti, tak v regulačním či nekódujícím regionu. V mnoha studiích byla prokázána asociace mezi alelickými variacemi v DBH genu a oběma biochemickými markery (enzymatickou aktivitou DBH v séru a hladinou DBH proteinu v CSF). V této souvislosti byly popsány polymorfismy: G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del a TaqI.

Pouze některé z výše uvedených polymorfismů byly studovány v souvislosti s ADHD. Zabetian et al., 2001 odhalili, že alela -1021T je asociována s kombinovaným subtypem ADHD. Wigg et al., 2002 pozorovali signifikantní vztah genotypu pro polymorfismy 5'-ins/del, TaqI a (CA)_n STR v rodinách s ADHD anamnézou, konkrétně TaqA2-del-A3 a TaqA2-ins-A4. Hawi et al., 2003 našli slabý nárůst transmise alely 444A v ADHD rodinách.



Obrázek č. 6: Znárodnění vybraných polymorfismů a vazebných klastrů v genu DBH. Červené obdelníky: kódující oblasti. Modré obdelníky: nekódující oblasti. Černé trojúhelníky: vazebné clustry.

Asociaci mezi TaqI a ADHD potvrdili Smith et al., 2003 (alela A1, absence TaqI restrikčního místa); Daly et al., 1999; Romain et al., 2003; Inkster et al., 2004; Kirley et al., 2002 (všichni s alelou A2, přítomnost TaqI restrikčního místa); Comings et al., 1996, 1999 ve skupině probandů s Tourettovým syndromem (B1 alela – vyšší skóre v ADHD testech). Rozporuplné výsledky u polymorfismu TaqI v DBH genu mohly být zapříčiněny populační stratifikací. Ta mohla způsobit falešně pozitivní asociaci A1 alely s ADHD (Smith et al., 2003).

V případě DBH mohou být vyšetřované polymorfismy G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del a TaqI (obecně lokusy na stejném chromozomu) ve vazebné nerovnováze. To znamená, že určitá kombinace alel se vyskytuje častěji než by odpovídalo náhodě. Při meotickém dělení buněk dochází k rekombinaci, čili k tvorbě nových kombinací alel „crossing-overem“ mezi jednotlivými lokusy. Pokud jsou dva lokusy na stejném chromozómu tak blízko sebe, že ke „crossing-overu“ v podstatě nedochází, jedná se o vazbu a tyto lokusy jsou přenášeny z generaci na generaci společně. Síla vazby je vyjadřována veličinami D' a r^2 .

V DBH existuje několik haplobloků (klastrů), ve kterých ke „crossing-overu“ téměř nedochází a každý z nich kosegreguje při meióze vcelku (nerozdělený), nezávisle na ostatních (viz obr. č.6). Vybrané polymorfismy v DBH jsou lokalizovány po celé délce genu a nespádají do stejného haplobloku.

2. Cíle práce

2.1. Hypotéza projektu a význam práce

Pro pochopení multifaktoriální etiologie ADHD a komorbidních poruch je potřebné odhalit co největší počet genů, které se podílí na vzniku, vývoji a závažnosti onemocnění. Dále je potřebné v těchto genech identifikovat funkční polymorfismy asociované s fenotypem a sledovat rozsah jejich působení na vznik a klinickou heterogenitu ADHD.

Studium jednotlivých transmitterových systémů a poznání vlivu genetického podkladu na jejich funkční změny může v budoucnosti pomoci při volbě vhodného psychofarmaka vzhledem k tomu, že v léčbě hyperkinetické poruchy se uplatňují látky s různým mechanismem účinku.

Strategie projektu proto byla následující:

- Sestavení skupiny 100 ADHD pacientů a skupiny 100 kontrolních jedinců
- Molekulárně genetická DNA analýza polymorfismů ve vybraných genech v obou souborech.
- Určení rizikové alely pro daný polymorfismus
- Určení rizikové kombinace alel
- Identifikace polymorfismů, které mají nejvýraznější vliv na ADHD a které mají vliv spíše minoritní

2.2. Konkrétní cíle

Konkrétně bylo pro úspěšné splnění výtčených cílů nutné splnit následující úkoly:

1. Sestavit skupinu 100 ADHD probandů, kteří splňovali kritéria pedopsychiatrického vyšetření dle DSM-IV a kritéria Connersovy škály pro rodiče a učitele.
2. Sestavit přesně definovanou skupinu 100 kontrolních jedinců stejného poměru pohlaví a etnického původu, u nichž byly příznaky ADHD vyloučeny.
3. Vybrat kandidátní geny (v rámci dopaminergního, serotoninergního a noradrenergního systému) a jejich funkční polymorfismy vhodné ke studiu na základě současných znalostí problematiky získaných z literatury a také z molekulární podstaty onemocnění.
4. Izolovat dostatečné množství genomické DNA dobré kvality z krve či ze vzorků slin všech probandů i kontrol.
5. Vyhledat specifické primery, navrhnout a optimalizovat vhodnou metodiku genotypování vybraných polymorfismů.
6. Provést molekulárně genetickou analýzu (RFLP i VNTR) vybraných polymorfismů ve skupině ADHD probandů i kontrol. Polymorfismy v DBH byly vybrány tak, aby neležely ve stejném haplobloku a nebyly v silné LD.
7. Zpracovat získané výsledky, statisticky je analyzovat a interpretovat.
 - Sledovat Hardy-Weinbergovu rovnováhu
 - Stanovit rizikové (problémové) alely
 - Stanovit hodnoty P , O.R. a C.I. 95% pro O.R. (vysvětlivky na str. 44)
 - Provést korekci na mnohočetné testování a power analýzu

3. Materiál a metody

3. 1. Soubor pacientů.

Molekulárně genetickými metodami bylo celkem vyšetřeno 100 pacientů s ADHD a 100 kontrolních jedinců. Pacienti k analýze byli získáni zejména na Psychiatrické klinice 1.LF UK v Praze, dále ve FN Motol a VFN Praha. Kontrolní skupina byla sestavena ze vzorků slin odebraných dětem na základních školách v Praze a z pediatrické ambulance MUDr. Pacltové. K diagnostikování ADHD bylo použito pedopsychiatrické vyšetření dle DSM-IV dvěma nezávislými posuzovateli s erudiicí dětského psychiatra a se zkušenostmi při výzkumu. Pacienti byli dále posouzeni pomocí Connersovy škály pro rodiče a učitele (Paclt et Florián, 1998; Achenbach et Edelbrock, 1983 český překlad Dr. Ptáček, 2005). Škály Connersové pro rodiče a učitele byly aplikovány nejen u dětí s ADHD, ale také u kontrolní skupiny zdravých dětí. Pro diagnózu hyperkinetické poruchy bylo nutné pozitivní vyšetření škálou Connersové pro rodiče a učitele (směrodatná odchylka 2 sigma od normy). U kontrolní skupiny bylo požadováno, aby odchylka byla menší než 1 sigma. Všechny klinické údaje spolu se získanými výsledky molekulárně genetických vyšetření byly deponovány v elektronické databázi.

3. 2. Izolace DNA.

Molekulárně genetická analýza všech ADHD pacientů a 34 kontrol byla prováděna na genomové DNA získané především z bílých krvinek z periferní krve. DNA byla izolována ze 3-10ml periferní krve odebrané do K₃EDTA. Výtěžek a kvalita DNA závisely na kvalitě výchozího materiálu a množství buněk přítomných ve vzorku. Izolace DNA byla prováděna z plné krve vysolovací metodou buď s použitím vlastních roztoků nebo pomocí kitu PUREGENE DNA Isolation Kit od firmy GENTRA. Nejdříve byly lyzovány červené krvinky neobsahující DNA a odděleny bílé krvinky, které byly lyzovány pomocí anionického detergentu v přítomnosti stabilizátoru DNA. Ten omezoval aktivitu DNAs přítomných v buňkách a v okolním prostředí. Dále byla působením RNAs degradována RNA. Další příměsi, zejména proteiny, byly odstraněny precipitací pomocí koncentrovaného solného roztoku. DNA rozpuštěná v supernatantu byla vysrážena pomocí alkoholu (100% isopropanolu), omyta 70% ethanolem, vysušena a poté rozpuštěna v pufru se stabilizátorem

DNA. Izolace kitem byla prováděna podle pokynů v manuálu. Molekulárně genetická analýza zbylých 66 kontrol byla provedena na genomové DNA získané ze slin. Sliny byly odebrány do speciálních nádob OraGene, které již obsahovaly purifikační kit, a následující postup probíhal dle instrukcí v OraGene DNA purifikačním protokolu ze 4 ml roztoku. Získaná DNA byla též rozpuštěna v pufru se stabilizátorem.

Kvalita DNA pak byla posouzena na spektrofotometru, kde byla sledována především její koncentrace a čistota (poměr absorbancí při vlnových délkách 260/280 nm). Čistá DNA bez kontaminace proteiny měla hodnotu tohoto poměru kolem 1,8. Zásobní vzorek DNA byl uchováván v mrazničce při teplotě -20°C .

3. 3. VNTR a RFLP analýza.

Analýza byla prováděna klasickou PCR, která umožnila amplifikovat cílovou sekvenci, lokalizovanou mezi dvěma speciálně navrženými oligonukleotidovými primery (viz tabulka č.4), jejichž sekvence byly převzaty z literatury. Tato metoda byla použita pro stanovení počtu tandemových opakování i k detekci restrikčních míst. PCR probíhala v objemu 15-25 μl za přítomnosti specifického množství DNA, MgCl_2 , primerů, dNTPs, pufr a 1 U polymerázy (Invitrogene, Fermentas či Biolase Diamond) v termocykleru Perkin Elmer 480 (složení směsi viz tabulka č.5). Podmínky PCR reakce se ve všech případech shodovaly v počáteční denaturaci 95°C 5 minut a finální extenzi 72°C 10 min, avšak annealingové a elongační teploty i časy byly odlišné (viz tabulka č.4). Další postup se lišil dle typu polymorfismu.

V případě RFLP v genu DBH (polymorfismy C-1021T, G444A, G910T, C1603T, C1912T, TaqI), DRD2 (TaqI) a DRD3 (Ser9Gly) byly PCR produkty nejprve štěpeny odpovídajícím restrikčním enzymem (viz tabulka č.4). Restrikce probíhala v objemu 15-20 μl při optimální teplotě charakteristické pro konkrétní enzym přes noc (16 hodin). Směs obsahovala 5-10 μl PCR produktu, vhodný pufr a enzym. Poté byly restrikční fragmenty smíšeny s roztokem D-sacharózy v poměru 5:1 a separovány elektroforézou BIORAD (110V) v 2 % agarózovém gelu. Následovala vizualizace pomocí ethidiumbromidu pod UV lampou a fotodokumentace (fotoaparát Kodak). Vyhodnocení analýzy probíhalo pomocí odečtu velikostí separovaných alel za pomoci 1 Kb⁺ Ladderu.

U VNTR polymorfismů (DAT1, 5-HTT) a 19 bp ins/del v DBH následovala separace v gelu, vizualizace a fotodokumentace přímo po PCR.

polymorfismus	primery	PCR podmínky	Restrikční enzym
DBH C-1021T RFLP	F: 5'-GGA GGG ACA GCT TCT AGT CC-3' R: 5'-CAC CTC TCC CTC CTG TCC TCT CGC-3'	Zabetian et al., 2003	HhaI (37°C; 0,2U; 20μl) Štěpená alela C
DBH 5'-ins/del VNTR	F: 5'-GCA AAA GTC AGG CAC ATG CAC C-3' R: 5'-CAA TAA TTT GGC CTC AAT CTT GG-3'	Cubells et al., 2000	
DBH G444A RFLP	F: 5'-CCT GGA GCC CAG TGC TTG TC-3' R: 5'-ACG CCC TCC TGG GTA CTC GC-3'	Cubells et al., 1998	EcoNI (37°C; 0,5U; 15μl) Štěpená alela G
DBH G910T RFLP	F: 5'-GCC CTC TCA GGA CAC ACC-3' R: 5'-ACA CAG CTG AGT CCT AGG G-3'	Počáteční denaturace 95°C 5min, následuje 3+3+25 cyklů 95°C/1min, 66, 64, 62°C/1min, 72°C/1min, finální extenze 72°C/10min.	MwoI (60°C; 2U; 20μl) Štěpená alela G
DBH C1603T RFLP	F: 5'-CCA GGG ACA GGA CTC GAG TTG-3' R: 5'-AGC AGT TTG GAG TGC AGA CCC-3'	Zabetian et al., 2003	BstUI (60°C; 1U; 20μl) Štěpená alela C
DBH C1912T RFLP	F: 5'-CCC ATG GAA CAG CCG TGC AC-3' R: 5'-ACA CCC TCT CAG CCA TGC AG-3'	Zabetian et al., 2003	ApaLI (37°C; 1U; 20μl) Štěpená alela C
DBH TaqI RFLP	F: 5'-CTG GAA GTT CAC TAC CAC-3' R: 5'-GTC GTT TCG TCC TGG GAG-3'	Počáteční denaturace 95°C 5min, následuje 30 cyklů 95°C/1min, 62°C/1min, 72°C/4min, finální extenze 72°C/10min.	TaqI (60°C 0,5U; 20μl) Štěpená alela B2
DRD2 TaqI RFLP	F: 5'-ACG GCT GGC CAA GTT GTC TA-3' R: 5'-ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA-3'	Počáteční denaturace 94°C 5min, následuje 35 cyklů 95°C/1min, 62°C/1min, 72°C/1min, finální extenze 72°C/10min.	TaqI (65°C; 1U; 20μl) Štěpená alela A2
DRD3 Ser9Gly RFLP	F: 5'-GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA-3' R: 5'-AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA-3'	Počáteční denaturace 95°C 5min, následuje 32 cyklů 95°C/1min, 56°C/1min, 72°C/1min, finální extenze 72°C/10min.	Ball/MscI (37°C; 1U; 20μl) Štěpená alela A2

polymorfismus	primery	PCR podmínky	Restrikční enzym
DAT1 VNTR	F: 5'-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AG -3' R: 5'-CTT CCT GGA GGT CAC GGC TCA AGG -3'	Počáteční denaturace 95°C 5min, následuje 30 cyklů 95°C/1min, 66°C/1,5min, 72°C/1,5min, finální extenze 72°C/10min.	-
5-HTT VNTR	F: 5'-ATG CCA GCA CCT AAC CCC TAA TGT-3' R: 5'-GGA CCG CAA GGT GGG CGG GA-3'	Počáteční denaturace 95°C 5min, následuje 30 cyklů 95°C/1min, 64°C/1min, 72°C/2min, finální extenze 72°C/15min.	-

Tabulka č.4: Přehled sekvencí primerů, restrikčních enzymů, PCR podmínek a podmínek štěpení pro jednotlivé polymorfismy. Šedě: polymorfismy v DBH.

polymorfismus	Objem (μl)	pufř	dNTPs (mM)	MgCl ₂ (mM)	primery (pmol)	PolyMate (%)
DBH G910T	20	1x Fermentas	0,8	1,8	10	
DBH TaqI	25	1x Invitrogene	0,25	1,8	10	
DRD2 TaqI	20	1x Fermentas	0,8	1,5	5	
DRD3 Ser9Gly	25	1x Fermentas	0,16	1,2	10	
DAT1 VNTR	15	1x Fermentas	0,2	2	15	
5-HTT VNTR	25	1x Biolase Diamond	0,4	10	25	28

Tabulka č.5: Složení PCR směsi pro polymorfismy u nichž nebyla metodika přežata z literatury.

3.4. Statistické analýza alelických asociačních studií

Úkolem asociačních studií je zjistit, nachází-li se určitá alela daného lokusu u postižených osob ve vyšší frekvenci než u kontrol, tedy je-li tato alela s onemocněním asociována. Mezi postiženými a nepostiženými jedinci v populaci (případ - kontrola) jsou porovnávány frekvence určité alely a síla asociace je vyjadřována podílem šancí (odds ratio, O.R.) vypočítaným z frekvence dané alely u pacientů a kontrol (viz dále).

3.4.1. Sledování HWE v kontrolní skupině

V kontrolní skupině byla sledována Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE) jako informace o tom, zda je zastoupení genotypů z generaci na generaci neměnné. Sledování HWE může sloužit jako ukazatel důvěryhodnosti molekulárně-genetické analýzy

polymorfismů, avšak náš soubor kontrolních jedinců nebyl vybrán náhodně, není proto kritérium splnění podmínky HWE jediným důvodem pro vyřazení polymorfismu ze studia. Nesplnění HWE může upozornit na situaci, kdy se frekvence mezi generacemi mění. Pro tento účel byly sestaveny kontingenční tabulky, které vyjadřovaly pozorované zastoupení jednotlivých genotypů. Z těchto hodnot byl zjištěn počet alel N_a a N_A a vypočtena jejich frekvence p (frekvence alely a) a q (frekvence alely A) v kontrolním souboru.

$$N_a = (2 \times N_{aa}) + (N_{aA})$$

$$N_A = (2 \times N_{AA}) + (N_{aA})$$

$$p = (2 \times N_{aa}) + (N_{aA}) / (2 \times N)$$

$$q = (2 \times N_{AA}) + (N_{aA}) / (2 \times N)$$

N_{aa} : počet pozorovaných homozygotů pro alelu a ; N_{AA} : počet pozorovaných homozygotů pro alelu A ; N_{aA} : počet pozorovaných heterozygotů; N : počet vyšetřených kontrol

Dále byl vypočten počet očekávaných genotypů N'

$$N'_{aa} = N_{aa} / (p^2 \times N)$$

$$N'_{aA} = N_{aA} / (pq \times N)$$

$$N'_{AA} = N_{AA} / (q^2 \times N)$$

a podle rovnice:

$$\chi^2 = \frac{(N - N')^2}{N'}$$

spočteny jednotlivé dílčí hodnoty χ^2 . Pro každý genotyp jednotlivých polymorfismů byly dílčí hodnoty χ^2 sečteny a pro tento součet zjištěna hodnota p (P) v MS Excel zadáním „=CHIDIST(a;b)“, kde „a“ je hodnota χ^2 a „b“ je počet stupňů volnosti (zadáno „1“). Pro χ^2 test Hardy-Wenbergovy rovnováhy byla nulová hypotéza taková, že frekvence pozorovaných genotypů se nebude lišit od očekávaných. Hodnota P , při které je nulová hypotéza přijata je $P > 0,05$. Pro situaci, kdy $P < 0,05$, je přijata alternativní hypotéza, dle které frekvence pozorovaných genotypů se od očekávaných liší.

Populace nemusí HWE odpovídat, je-li porušena některá z podmínek Hardy-Weinbergova zákona:

- 1) nedochází k náhodnému párování mezi jedinci. Faktory, které narušují náhodný výběr jedinců mohou být stratifikace, asortativní sňatky a konsanguinita.
- 2) frekvence alel nezůstávají po dlouhou dobu konstantní vlivem mutace, selekce, migrací jedinců.

Jestliže HWE neplatí, je důležité analyzovat proč. Která z předpokládaných podmínek není splněna a jak nás to poučí o situaci v dané populaci.

3.4.2. Vlastní výpočty – univariátní model

Výpočet podílu šancí (O.R.) byl prováděn pro dva modely. Alelický model, kdy rizikový genotyp je nosičství dané alely (a) a pro výpočet je důležitý poměr vůči alele A v obou vyšetřovaných skupinách. A recesivní model, kdy se předpokládá, že rizikový genotyp je homozygotní stav (aa), k výpočtu byl pak použit poměr s homozygoty pro předpokládanou nerizikovou alelu (AA). Výpočty byly provedeny pro každý polymorfismus dvakrát:

- 1) za předpokladu rizikové alely a
- 2) za předpokladu rizikové alely A

Porovnáním získaných hodnot bylo možné určit rizikovou alelu pro konkrétní polymorfismus. Ve výsledcích je zahrnut i model heterozygotní (výpočet pro poměr heterozygoti vs homozygoti pro předpokládanou nerizikovou alelu) kvůli možnému srovnání O.R. s recesivním modelem a proveden Armitův trend test (modifikovaný F-test).

alelický model	pacienti	kontroly
počet alel p (rizikových)	a	b
počet alel q (nerizikových)	c	d

recesivní model	pacienti	kontroly
počet homozygotů pro rizikovou alelu	a	b
ostatní genotypy	c	d

$$\text{Podíl šancí O.R.} = \frac{(a \times d)}{(b \times c)}$$

Je-li frekvence studované alely shodná u pacientů a kontrol, je podíl šancí roven 0. Při aditivním efektu alel platí, že $\text{O.R.}_{\text{recesivní model}} > \text{O.R.}_{\text{alelický model}}$. Při plné aditivitě platí, že $\text{O.R.}_{\text{recesivní model}} = (\text{O.R.}_{\text{alelický model}})^2$.

Ke zjištění, zda jsou údaje statisticky signifikantní, je třeba znát hodnotu χ^2 , hodnotu P (byly získány stejně jako v případě testování HWE - doplněním pozorovaných genotypů, vypočítáním očekávaných genotypů pro alelický i recesivní model, zjištěním dílčích hodnot χ^2 , vypočtením hodnoty P pro celkový χ^2 viz výše) a hodnotu 95% konfidenčního intervalu (C.I. 95%) pro O.R. (při signifikantní asociaci nepřesahuje číslo 1). Výsledky byly brány jako statisticky signifikantní v případě, že $P < 0,05$.

Pro polymorfismy v DBH, které se ukázaly jako asociované s ADHD, byla provedena haplotypová analýza. Což je zhodnocení synergisticky působících syntenních polymorfismů.

Na závěr byla provedena korekce na mnohočetné testování (corr P) a POWER analýza (Power = pravděpodobnost nálezu skutečné asociace). Přijatelný power $> 80\%$, odpovídá $< 20\%$ pravděpodobnosti falešné positivity. V případě, že platí power < 80 , je potřeba rozšířit sledované soubory. Dalšími výpočty lze zjistit potřebný počet ADHD pacientů a kontrolních jedinců. Polymorfismy, které se ukázaly asociované s ADHD i po korekci na mnohočetné testování a power analýze, byly ještě podrobeny korekci na pohlaví, protože poměr chlapci:dívky není v obou souborech totožný.

4. Výsledky

4.1. Databáze

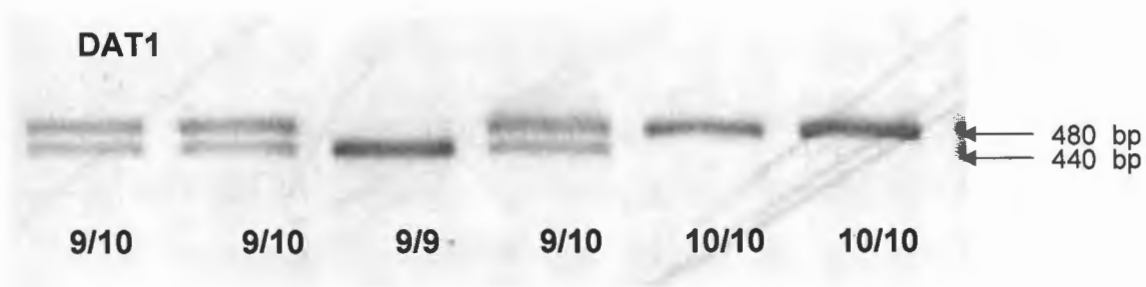
Byla vytvořena elektronická databáze ADHD pacientů, kteří splňovali diagnostická kritéria DSM-IV a měli pozitivní vyšetření škálou Connersové pro rodiče a učitele (dotazník viz příloha), a kontrol, u nichž výsledek vyšetření škálou Connersové vyloučil klíčové symptomy ADHD. Pro lepší orientaci a statistické zpracování byli pacienti označeni číslicí 1 a kontroly číslicí 2. Do databáze byly zaznamenávány výsledky molekulárně-genetické analýzy jedenácti lokusů. Homozygoti pro polymorfní alely byly označovány 1 a 3, heterozygoti 2. Databáze byla pravidelně zálohována. V tabulce č. 6 je uveden celkový počet, poměr pohlaví a věkové rozpětí studovaného souboru.

	Pacienti	Kontroly
Celkový počet	100	100
Poměr chlapci:dívky	89:11	63:47
Věkové rozmezí	4-11 let	4-30 let

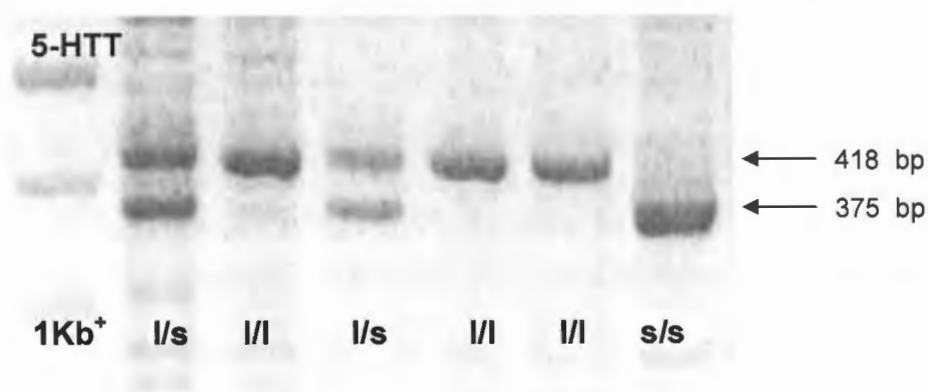
Tabulka č. 6: Studijní soubor pacientů a kontrol.

4.2. VNTR analýza.

Pro polymorfismy v DAT1 a 5-HTT byly nejprve optimalizovány PCR podmínky. Annealingová teplota byla vypočítána dle vzorce: $T = (N_{(AT)} \times 2) + (N_{(GC)} \times 4) - 3$ a poté ověřena PCR při teplotním gradientu, který obsahoval vypočtenou teplotu T a dále teploty po 1,5°C nad i pod T . PCR pro polymorfismus DBH 19 bp ins/del byla prováděna dle instrukcí v článku (viz Metody). Na obrázcích č. 7 a 8 je ukázka analýzy metodou VNTR.



Obrázek č. 7: Vyšetření DAT1 genu na polymorfismus v počtu 40 bp opakování; elektroforetická separace ve 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí EtBr pod UV lampou. 9 opakování má v daném amplifikovaném fragmentu 440 bp a 10 opakování 480 bp. Čísla v řádku jsou počty opakování.

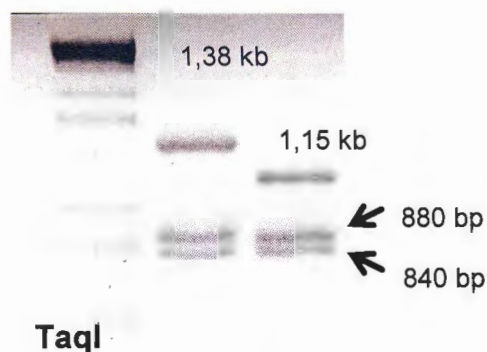


Obrázek č. 8: Vyšetření 5-HTT genu na polymorfismus v počtu 20-23 bp opakování; elektroforetická separace ve 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí EtBr pod UV lampou. *l* alela s 16 opakováními má v daném amplifikovaném fragmentu 419 bp a *s* alela se 14 opakováními 375 bp. V první dráze je délkový marker.

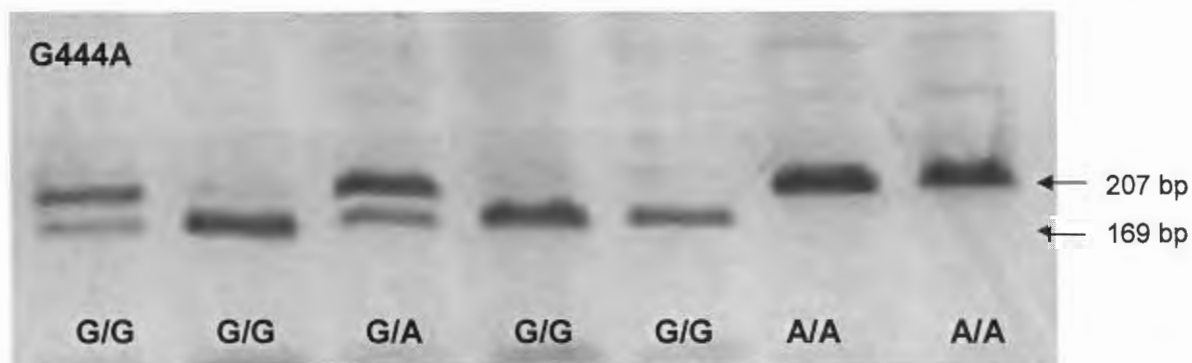
4.3. RFLP analýza.

PCR pro polymorfismy C-1021T, G444A, C1603T a C1912T v genu DBH byla prováděna dle údajů v člancích (viz Metody). C-1021T, C1603T a C1912T bylo možné amplifikovat v jednom běhu termocyklieru díky využití „touch-down PCR“, kdy se teplota postupně snižovala po 3 cyklech o 2°C. Pro polymorfismy DBH G910T, DBH TaqI, DRD2 TaqI a DRD3 Ser9Gly byly PCR podmínky optimalizovány stejně jako v případě genů DAT1 a 5-HTT (viz výše). V PCR u TaqI polymorfismu bylo nutné prodloužit elongační fázi až na 4 minuty, aby se fragmenty dlouhé přes 2 kb mohly dobře amplifikovat.

Na obrázcích č. 9 a 10 je ukázka analýzy metodou RFLP.



Obrázek č. 9: Vyšetření DBH genu na TaqI polymorfismus; elektroforetická separace v 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí EtBr pod UV lampou. V první dráze je délkový marker, ve druhé je alela B1 a ve třetí alela B2. Pruhy o délkách 880 a 840 párů bází jsou konstantní. Pruh o délce 1380 bp je známkou nepřítomnosti TaqI restrikčního místa v B1 alele.



Obrázek č. 10: Vyšetření DBH genu na G444A polymorfismus; elektroforetická separace v 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí EtBr pod UV lampou. Pruhy o délce 207 bp neobsahují restrikční místo pro enzym EcoNI (alela A), alela G je štěpena – pruhy o délce 169 a 38 bp (38 bp nejsou uvedeny na obrázku).

4.4. Výsledky molekulárně-genetické analýzy.

V tabulkách č. 7 a 8 jsou přehledně shrnuty výsledné počty jednotlivých genotypů v kontrolní skupině a skupině ADHD pacientů získané molekulárně-genetickou analýzou.

polymorfismus	genotyp 1 (alely 11)	genotyp 2 (alely 12)	genotyp 3 (alely 22)	celkem
DBH C-1021T	69 (CC)	25 (CT)	6 (TT)	100
19 bp ins/del	39 (ins)	37 (i/d)	24 (del)	100
G444A	18 (GG)	55 (AG)	27 (AA)	100
G910T	85 (GG)	12 (GT)	3 (TT)	100
C1603T	85 (CC)	15 (CT)	0 (TT)	100
C1912T	78 (CC)	19 (CT)	3 (TT)	100
TaqI	20 (22)	49 (12)	31 (11)	100
DRD2 TaqI	24 (22)	40 (12)	36 (11)	100
DRD3 Ser9Gly	2 (22)	55 (12)	43 (11)	100
DAT1 VNTR	2 (9/9)	39 (9/10)	59 (10/10)	100
5-HTT VNTR	16 (ss)	55 (sl)	29 (ll)	100

Tabulka č. 7: Pozorované zastoupení genotypů v kontrolní skupině
1: alela A; 2: alela a.

polymorfismus	genotyp 1 (alely 11)	genotyp 2 (alely 12)	genotyp 3 (alely 22)	celkem
DBH C-1021T	77 (CC)	23 (CT)	0 (TT)	100
19 bp ins/del	40 (ins)	41 (i/d)	19 (del)	100
G444A	28 (GG)	57 (AG)	15 (AA)	100
G910T	83 (GG)	17 (GT)	0 (TT)	100
C1603T	98 (CC)	2 (CT)	0 (TT)	100
C1912T	86 (CC)	14 (CT)	0 (TT)	100
TaqI	21 (22)	51 (12)	28 (11)	100
DRD2 TaqI	73 (22)	25 (12)	2 (11)	100
DRD3 Ser9Gly	17 (22)	32 (12)	51 (11)	100
DAT1 VNTR	11 (9/9)	40 (9/10)	49 (10/10)	100
5-HTT VNTR	48 (ss)	39 (sl)	13 (ll)	100

Tabulka č. 8: Pozorované zastoupení genotypů ve skupině ADHD pacientů
1: alela A; 2: alela a.

4.5. Statistická analýza alelických asociačních studií

4.5.1. Kontingenční tabulky pro jednotlivé polymorfismy

Pro další výpočty bylo nejprve potřeba sestavit kontingenční tabulky vyjadřující pozorovaný počet genotypů u ADHD pacientů a kontrol pro konkrétní polymorfismus.

DBH C-1021T	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (CC)	77	69	146
Genotyp 2 (CT)	23	25	48
Genotyp 3 (TT)	0	6	6
Celkový součet	100	100	200

DBH 19bp			
ins/del	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (ii)	40	39	79
Genotyp 2 (id)	41	37	76
Genotyp 3 (dd)	19	24	45
Celkový součet	100	100	200

DBH G444A	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (GG)	28	18	45
Genotyp 2 (GA)	57	55	113
Genotyp 3 (AA)	15	27	42
Celkový součet	100	100	200

DBH G910T	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (GG)	83	85	168
Genotyp 2 (GT)	17	12	29
Genotyp 3 (TT)	0	3	3
Celkový součet	100	100	200

DBH C1603T	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (CC)	98	85	183
Genotyp 2 (CT)	2	15	17
Genotyp 3 (TT)	0	0	0
Celkový součet	100	100	200

DBH TaqI	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (11)	21	20	41
Genotyp 2 (12)	51	49	100
Genotyp 3 (22)	28	31	59
Celkový součet	100	100	200

DBH C1912T	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (CC)	86	78	164
Genotyp 2 (CT)	14	19	33
Genotyp 3 (TT)	0	3	3
Celkový součet	100	100	200

DRD2 TaqI	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (22)	73	24	97
Genotyp 2 (21)	25	40	65
Genotyp 3 (11)	2	36	38
Celkový součet	100	100	200

DRD3 Ser9Gly	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (22)	17	2	19
Genotyp 2 (21)	32	55	88
Genotyp 3 (11)	51	43	93
Celkový součet	100	100	200

DAT1 VNTR	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (99)	11	2	13
Genotyp 2 910	40	39	78
Genotyp 3 1010	49	59	109
Celkový součet	100	100	200

5-HTT

VNTR	Kontroly	Pacienti	Součet
Genotyp 1 (ss)	48	16	64
Genotyp 2 (sl)	39	55	92
Genotyp 3 (ll)	13	29	44
Celkový součet	100	100	200

4.5.2. Sledování HWE v kontrolní skupině.

Před vlastním výpočtem asociace bylo sledováno, zda jsou genotypy kontrolní skupiny v Hardy-Weinbergově rovnováze. HWE slouží jako informace o tom, zda je zastoupení genotypů z generaci na generaci neměnné. U polymorfismu Ser9Gly v genu DRD3 má *P* hodnotu o řád nižší než 0,05 (0,0057), podmínka HWE není splněna. Výsledky molekulárně-genetické analýzy u tohoto polymorfismu byly tedy ještě jednou ověřeny (zjištěna opět hodnota $P=0,0057$) a porovnány s HapMap databází (www.hapmap.org, databáze obsahující > 1 100 000 SNP sledovaných v různých populacích) konkrétně s údaji získanými ve skupině jedinců evropského původu (CEU). Naše data jsou u všech polymorfismů (které lze

v databázi vyhledat) srovnatelná včetně polymorfismu Ser9Gly v DBH. Z uvedeného vyplývá, že frekvence alel a zastoupení genotypů u tohoto polymorfismu se mezi generacemi mění. Ostatní polymorfismy leží v HWE (srovnání viz tabulka č. 9).

polymorfismus	Suma χ^2	<i>P</i> , 1 stupeň volnosti
DBH C-1021T	1,68853	0,19380
DBH 19 bp ins/del	2,02122	0,15511
DBH G444A	2,54713	0,11050
DBH G910T	0,86297	0,35291
DBH C1603T	0,0102	0,91954
DBH C1912T	0,56654	0,45164
DBH TaqI	0,06241	0,80241
DRD2 TaqI	0,00684	0,93411
DRD3 Ser9Gly	6,72585	0,00572
DAT1 VNTR	0,42229	0,51580
5-HTTVNTR	1,23457	0,26652

Tabulka č. 9: χ^2 test pro zjištění Hardy-Weinbergovy rovnováhy v kontrolní skupině. HWE platí pro $P > 0,05$; hraniční $0,1 > P > 0,05$. Žlutě: polymorfismus, který v kontrolní skupině není v HWE.

4.5.3. Výpočet podílu šancí a 95 % konfidenčního intervalu.

Ke zjištění, zda jsou rozdíly mezi pacienty a kontrolami statisticky významné, je třeba znát hodnotu χ^2 , hodnotu *P* a hodnotu 95% konfidenčního intervalu (C.I. 95%) pro O.R. Statisticky významné jsou považovány výsledky kdy platí, že $P < 0,05$ a C.I. nepřesahuje číslo 1. Výpočet podílu šancí (O.R.) byl prováděn pro dva modely, alelický a recesivní model a pro každý polymorfismus dvakrát (1 – za předpokladu, že riziková alela je a; 2 – za předpokladu, že riziková alela je A). V následující tabulce je zahrnut i výpočet pro poměr heterozygoti vs homozygoti pro předpokládanou nerizikovou alelu a proveden Armitův trend test (modifikace F-testu).

Vysvětlivky pro následující tabulku č. 10:

n_{11} pozorovaný počet homozygotů pro alelu A

n_{12} pozorovaný počet heterozygotů

n_{22} pozorovaný počet homozygotů pro alelu a

(údaje v závorkách).... očekávané rozdělení genotypů

Odds ratio (O.R.)....vyjadřuje sílu asociace mezi rizikovou alelou a onemocněním.

Pro O.R. = 1 není asociace; O.R. > 1 alela zvyšuje riziko onemocnění;

O.R. < 1 alela snižuje riziko onemocnění.

C.I. 95%.... konfidenční interval pro O.R. Interval spolehlivosti výsledků. Čím je C.I. užší, tím spolehlivější jsou výsledky. O signifikanci výsledku svědčí hodnota C.I. 95%>1.

χ^2test, pomocí něhož lze ověřit, zda původní hypotéza o rozdělení χ (náhodných veličin) je správná. Ověřuje shodu mezi pozorovaným a předpokládaným pravděpodobnostním modelem.

$p(P)$hodnota P získaná z χ^2 testu. Hodnota $P>0,05$ – přijata nulová hypotéza (frekvence pozorovaných genotypů se nebude lišit od očekávaných); $P<0,05$ - přijata alternativní hypotéza (frekvence pozorovaných genotypů se od očekávaných liší).

POWER...pravděpodobnost nálezu skutečné asociace

Na obr. č. 11 jsou pro přehlednost vyjádřeny v grafech hodnoty O.R. a konfidenční intervaly alelického i recesivního modelu pro každý polymorfismus a v tabulce č. 11 jsou shrnuty hodnoty P a O.R. pro polymorfismy, u kterých byl zjištěn statisticky signifikantní výsledek.

Hardy Weinbergovo equilibrium		Testy asociace (C.I.: 95% confidence interval)			
DRD2 TaqI					
Kontroly	Pacienti	alelický model	heterozygoti vs homo	homozygoti vs ostatní	Armitage's trend test
n11=73 (73.10)	n11=24 (19.36)				
n12=25 (24.80)	n12=40 (49.28)				
n22=2 (2.10)	n22=36 (31.36)				
			Riziková alela 2		
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=7.505	Odds_ratio=4.867	Odds_ratio=54.750	Odds_ratio=6.973
p=0.934108	p=0.059685	C.I.=[4.632-12.159]	C.I.=[2.466-9.606]	C.I.=[12.257-244.565]	
		chi2=75.46	chi2=22.05	chi2=54.18	chi2=58.58
		p=3.735e-18 (P)	p=2.657e-06	p=1.833e-13	p=1.950e-14
			Riziková alela 1		
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.133	Odds_ratio=0.089	Odds_ratio=0.018	Odds_ratio=0.158
		C.I.=[0.082-0.216]	C.I.=[0.020-0.402]	C.I.=[0.004-0.082]	
		chi2=75.46	chi2=13.66	chi2=54.18	chi2=58.58
		p=3.735e-18 (P)	p=0.00022	p=1.833e-13	p=1.950e-14
DRD3 Ser9Gly					
n11=17 (10.89)	n11=2 (8.70)				
n12=32 (44.22)	n12=55 (41.59)				
n22=51 (44.89)	n22=43 (49.70)				
			Riziková alela 2		
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=1.177	Odds_ratio=14.609	Odds_ratio=7.167	Odds_ratio=1.642
p=0.005719	p=0.001270	C.I.=[0.771-1.797]	C.I.=[3.168-67.374]	C.I.=[1.567-32.778]	
		chi2=0.57	chi2=17.42	chi2=8.18	chi2=0.58
		p=0.45019 (P)	p=0.00003	p=0.00423	p=0.44736
			Riziková alela 1		
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.850	Odds_ratio=2.039	Odds_ratio=0.140	Odds_ratio=0.756
		C.I.=[0.556-1.297]	C.I.=[1.124-3.698]	C.I.=[0.031-0.638]	
		chi2=0.57	chi2=5.56	chi2=8.18	chi2=0.58
		p=0.45019 (P)	p=0.01841	p=0.00423	p=0.44736
5-HTT VNTR					
n11=48 (45.56)	n11=16 (18.92)				
n12=39 (43.88)	n12=55 (49.16)				
n22=13 (10.56)	n22=29 (31.92)				
			Riziková alela 2		
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=2.698	Odds_ratio=4.231	Odds_ratio=6.692	Odds_ratio=2.628
p=0.266521	p=0.234402	C.I.=[1.796-4.053]	C.I.=[2.103-8.510]	C.I.=[2.818-15.893]	
		chi2=23.32	chi2=17.28	chi2=20.14	chi2=22.24
		p=1.370e-06 (P)	p=0.00003	p=7.201e-06	p=2.401e-06
			Riziková alela 1		
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.371	Odds_ratio=0.632	Odds_ratio=0.149	Odds_ratio=0.376
		C.I.=[0.247-0.557]	C.I.=[0.292-1.368]	C.I.=[0.063-0.355]	
		chi2=23.32	chi2=1.36	chi2=20.14	chi2=22.24
		p=1.370e-06 (P)	p=0.24271	p=7.201e-06	p=2.401e-06

DAT1 VNTR

n11=11 (9.61) n11=2 (4.62)
 n12=40 (42.78) n12=39 (33.76)
 n22=49 (47.61) n22=59 (61.62)

Riziková alela 2

	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
	Odds_ratio=1.640	Odds_ratio=5.362	Odds_ratio=6.622	Odds_ratio=1.994
p=0.515798	C.I.=[1.045-2.576]	C.I.=[1.116-25.772]	C.I.=[1.401-31.312]	
	chi2=4.66	chi2=5.22	chi2=7.15	chi2=4.76
	p=0.03084 (P)	p=0.02235	p=0.00750	p=0.02917

Riziková alela 1

	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
	Odds_ratio=0.610	Odds_ratio=0.810	Odds_ratio=0.151	Odds_ratio=0.559
	C.I.=[0.388-0.957]	C.I.=[0.453-1.448]	C.I.=[0.032-0.714]	
	chi2=4.66	chi2=0.51	chi2=7.15	chi2=4.76
	p=0.03084 (P)	p=0.47661	p=0.00750	p=0.02917

DBH G910T

n11=83 (83.72) n11=85 (82.81)
 n12=17 (15.55) n12=12 (16.38)
 n22=0 (0.72) n22=3 (0.81)

Riziková alela 2

	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
	Odds_ratio=1.065	Odds_ratio=0.689	Odds_ratio=6.836	Odds_ratio=1.701
p=0.352909	C.I.=[0.532-2.131]	C.I.=[0.310-1.532]	C.I.=[0.348-134.388]	
	chi2=0.03	chi2=0.84	chi2=2.88	chi2=0.03
	p=0.85955 (P)	p=0.35929	p=0.08968	p=0.86553

Riziková alela 1

	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
	Odds_ratio=0.939	Odds_ratio=0.102	Odds_ratio=0.146	Odds_ratio=0.902
	C.I.=[0.469-1.880]	C.I.=[0.005-2.156]	C.I.=[0.007-2.876]	
	chi2=0.03	chi2=3.75	chi2=2.88	chi2=0.03
	p=0.85955 (P)	p=0.05275	p=0.08968	p=0.86553

DBH G444A

n11=28 (31.92) n11=18 (20.70)
 n12=57 (49.16) n12=55 (49.59)
 n22=15 (18.92) n22=27 (29.70)

Riziková alela 2

	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
	Odds_ratio=1.556	Odds_ratio=1.501	Odds_ratio=2.800	Odds_ratio=1.671
p=0.110495	C.I.=[1.049-2.308]	C.I.=[0.747-3.018]	C.I.=[1.178-6.653]	
	chi2=4.84	chi2=1.31	chi2=5.56	chi2=5.51
	p=0.02778 (P)	p=0.25316	p=0.01838	p=0.01896

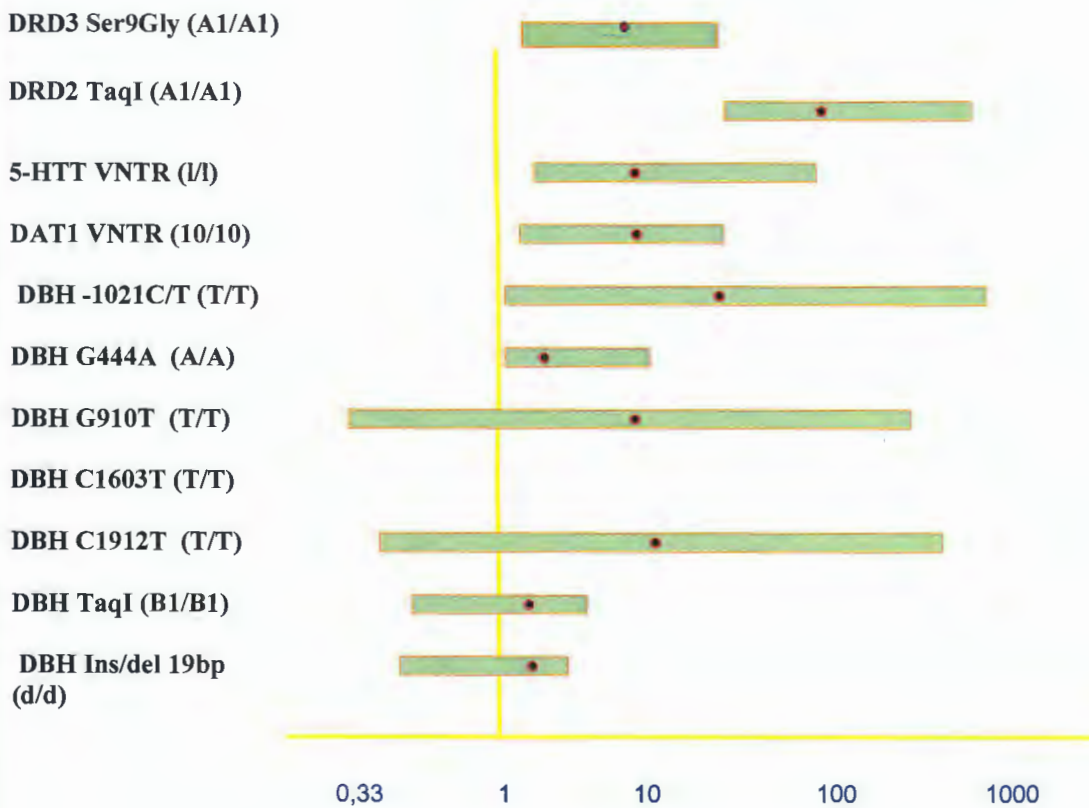
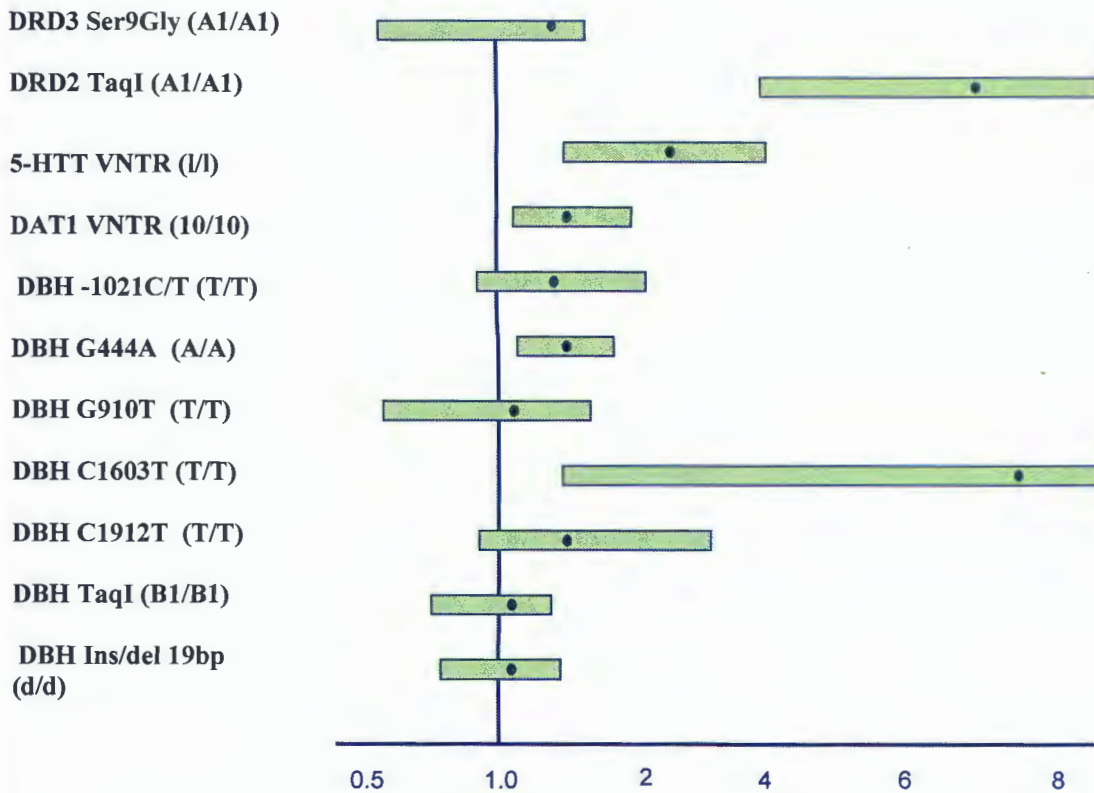
Riziková alela 1

	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
	Odds_ratio=0.643	Odds_ratio=0.536	Odds_ratio=0.357	Odds_ratio=0.599
	C.I.=[0.433-0.954]	C.I.=[0.258-1.114]	C.I.=[0.150-0.849]	
	chi2=4.84	chi2=2.83	chi2=5.56	chi2=5.51
	p=0.02778 (P)	p=0.09270	p=0.01838	p=0.01896

DBH Taql					
n11=21 (21.62)	n11=20 (19.80)				
n12=51 (49.76)	n12=49 (49.40)				
n22=28 (28.62)	n22=31 (30.80)				
		Riziková alela 2			
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=1.084	Odds_ratio=1.009	Odds_ratio=1.163	Odds_ratio=1.082
p=0.802412	p=0.936263	C.I.=[0.731-1.607]	C.I.=[0.488-2.087]	C.I.=[0.524-2.581]	
		chi2=0.16	chi2=0.00	chi2=0.14	chi2=0.16
		p=0.68796 (P)	p=0.98111	p=0.71129	p=0.68674
		Riziková alela 1			
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.923	Odds_ratio=0.868	Odds_ratio=0.860	Odds_ratio=0.924
		C.I.=[0.622-1.368]	C.I.=[0.456-1.652]	C.I.=[0.387-1.910]	
		chi2=0.16	chi2=0.19	chi2=0.14	chi2=0.16
		p=0.68796 (P)	p=0.66605	p=0.71129	p=0.68674
DBH 19 bp ins/del					
n11=40 (36.60)	n11=39 (33.06)				
n12=41 (47.80)	n12=37 (48.88)				
n22=19 (15.60)	n22=24 (18.06)				
		Riziková alela 2			
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=1.132	Odds_ratio=0.926	Odds_ratio=1.296	Odds_ratio=1.123
p=0.155114	p=0.015113	C.I.=[0.760-1.687]	C.I.=[0.495-1.731]	C.I.=[0.614-2.732]	
		chi2=0.37	chi2=0.06	chi2=0.46	chi2=0.31
		p=0.54189 (P)	p=0.80871	p=0.49604	p=0.57668
		Riziková alela 1			
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.883	Odds_ratio=0.714	Odds_ratio=0.772	Odds_ratio=0.891
		C.I.=[0.593-1.316]	C.I.=[0.338-1.510]	C.I.=[0.366-1.628]	
		chi2=0.37	chi2=0.78	chi2=0.46	chi2=0.31
		p=0.54189 (P)	p=0.37766	p=0.49604	p=0.57668
DBH C-1021T					
n11=77 (78.32)	n11=73 (69.72)				
n12=23 (20.36)	n12=21 (27.55)				
n22=0 (1.32)	n22=6 (2.72)				
		Riziková alela 2			
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	common odds ratio
		Odds_ratio=1.521	Odds_ratio=0.963	Odds_ratio=13.707	Odds_ratio=2.651
p=0.193795	p=0.017365	C.I.=[0.858-2.697]	C.I.=[0.492-1.887]	C.I.=[0.759-247.653]	
		chi2=2.08	chi2=0.01	chi2=6.08	chi2=1.91
		p=0.14959 (P)	p=0.91270	p=0.01366	p=0.16682
		Riziková alela 1			
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	common odds ratio
		Odds_ratio=0.658	Odds_ratio=0.070	Odds_ratio=0.073	Odds_ratio=0.669
		C.I.=[0.371-1.166]	C.I.=[0.004-1.325]	C.I.=[0.004-1.318]	
		chi2=2.08	chi2=5.81	chi2=6.08	chi2=1.91
		p=0.14959 (P)	p=0.01595	p=0.01366	p=0.16682

DBH C1603T					
n11=98 (98.01)	n11=85 (85.56)				
n12=2 (1.98)	n12=15 (13.88)				
n22=0 (0.01)	n22=0 (0.56)				
		Riziková alela 2			common odds ratio
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	
		Odds_ratio=8.027	Odds_ratio=8.647	Odds_ratio=1.152	Odds_ratio=8.647
p=0.919542	p=0.417474	C.I.=[1.811-35.580]	C.I.=[1.922-38.898]	C.I.=[0.023-58.684]	
		chi2=10.38	chi2=10.86	chi2=N/A	chi2=10.86
		p=0.00127 (P)	p=0.00098	p=1.00000	p=0.00098
		Riziková alela 1			common odds ratio
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	
		Odds_ratio=0.125	Odds_ratio=6.200	Odds_ratio=0.868	Odds_ratio=0.277
		C.I.=[0.028-0.552]	C.I.=[0.099-389.879]	C.I.=[0.017-44.216]	
		chi2=10.38	chi2=N/A	chi2=N/A	chi2=10.86
		p=0.00127 (P)	p=1.00000	p=1.00000	p=0.00098
DBH C1912T					
n11=86 (86.49)	n11=78 (76.56)				
n12=14 (13.02)	n12=19 (21.88)				
n22=0 (0.49)	n22=3 (1.56)				
		Riziková alela 2			common odds ratio
		[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11]<->[22]	
		Odds_ratio=1.898	Odds_ratio=1.496	Odds_ratio=7.713	Odds_ratio=2.822
p=0.451637	p=0.188750	C.I.=[0.956-3.769]	C.I.=[0.703-3.185]	C.I.=[0.392-151.692]	
		chi2=3.44	chi2=1.10	chi2=3.24	chi2=3.24
		p=0.06372 (P)	p=0.29374	p=0.07171	p=0.07205
		Riziková alela 1			common odds ratio
		[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	
		Odds_ratio=0.527	Odds_ratio=0.192	Odds_ratio=0.130	Odds_ratio=0.557
		C.I.=[0.265-1.046]	C.I.=[0.009-4.017]	C.I.=[0.007-2.550]	
		chi2=3.44	chi2=2.08	chi2=3.24	chi2=3.24
		p=0.06372 (P)	p=0.14898	p=0.07171	p=0.07205

Tabulka č. 10: Výpočet podílu šancí a C.I. 95%. Alely, které z výpočtů vplynuly jako asociované s ADHD jsou u všech polymorfismů označeny jako alela 2. Vysvětlivky na straně 44. N/A: non-aplicable, výpočet nelze provést, ve skupině nebyl detekován žádný homozygot pro rizikovou alelu.



Obrázek č 11: Výsledky univariální analýzy. Nahoře: alelický model. Dole: recesivní model. Tečky – podíl šancí O.R. Zeleně – C.I. 95%. Výsledky jsou signifikantní nepřesahuje-li hodnota C.I. 95 % hodnotu 1. Vysvětlivky na straně 44.

	gen	polymorphismus	model	P hodnota	O.R.
1	DRD2	TaqI	alel	3,74e-18	7,50
2	DRD2	TaqI	reces	1,83e-13	54,75
3	5-HTT	VNTR	alel	1,37e-06	2,70
4	5-HTT	VNTR	reces	7,20e-06	6,70
5	DAT1	VNTR	alel	3,08e-02	1,64
6	DAT1	VNTR	reces	7,50e-03	6,62
7	DBH	G444A	alel	2,78e-02	1,57
8	DBH	G444A	reces	1,84e-02	2,80
10	DBH	C1021T	reces	1,37e-02	13,71
11	DBH	C1603T	alel	1,27e-03	8,03
12	DBH	C1603T	reces	1,00e+00	1,15

Tabulka č. 11: Souhrnný přehled hodnot *P* a *O.R.* pro polymorfismy, které splňovaly $P < 0,05$. Hodnota *O.R.* vyjadřuje, kolikrát je predispozice k onemocnění vyšší v přítomnosti rizikové alely (alelický model) či u homozygotů pro rizikovou alelu (recesivní model).

4.5.4. Korekce na mnohočetné testování

V případě, že je testováno více polymorfismů, je nutné provést korekci závěrečných výsledků. *Corr P* je hodnota *P* korigovaná na mnohočetné testování. Tedy *P* value konkrétního polymorfismu je násobena počtem polymorfismů, které byly detekovány jako asociované s ADHD a leží v tabulce na pozici pod daným polymorfismem. Též byla provedena power analýza, která vyjadřuje pravděpodobnost nálezu skutečné asociace.

#	gen	polymorphismus	model	P value	corr P	Power %
1	DRD2	TaqI	alel	3,74e-18	4,48e-17	100
2	DRD2	TaqI	reces	1,83e-13	2,02e-12	100
3	5-HTT	VNTR	alel	1,37e-06	1,37e-05	93.3
4	5-HTT	VNTR	reces	7,20e-06	6,48e-05	100
11	DBH	C1603T	alel	0,001	0,008	70.8
5	DAT1	VNTR	alel	0,031	0,031	N/A
6	DAT1	VNTR	reces	0,008	0,038	100
10	DBH	C-1021T	reces	0,014	0,055	N/A
8	DBH	G444A	reces	0,018	0,055	N/A
7	DBH	G444A	alel	0,028	0,056	33.4
9	DBH	C-1021T	alel	0,150	0,299	N/A
12	DBH	C1603T	reces	1,000	1,000	100

Tabulka č.12: Korigované hodnoty *P* na mnohočetné testování. V tabulce jsou uvedena data pro polymorfismy, které se z výpočtů i po dvojité korekci projevily jako asociované s ADHD. Žlutá: polymorfismy mající signifikantní hodnotu výsledku. N/A: non-applicable, výpočet nelze provést, ve skupině nebyl detekován homozygot pro rizikovou alelu. Řazeno dle *corr P*.

4.5.5. Korekce na pohlaví

Protože poměry chlapců a dívek se v souboru ADHD pacientů a kontrolní skupině lišily, byla provedena korekce na pohlaví metodou logistické regrese. Všechny asociace, které splnily původní dvojitý filtr (korekce na mnohočetné testování a power analýzu), zůstaly po korekci hodnoty P na pohlaví signifikantní (viz tabulka č. 13).

#	gen	polymorphismus	model	P value	corr P	Power %	Sex corr P
1	DRD2	TaqI	alel	3,74e-18	4,48e-17	100	10 ⁻¹⁵
2	DRD2	TaqI	reces	1,83e-13	2,02e-12	100	10 ⁻⁰⁷
3	5-HTT	VNTR	alel	1,37e-06	1,37e-05	93.3	10 ⁻⁰⁴
4	5-HTT	VNTR	reces	7,20e-06	6,48e-05	100	10 ⁻⁰⁴
11	DBH	C1603T	alel	0,001	0,008	70.8	N/A
5	DAT1	VNTR	alel	0,031	0,031	N/A	N/A
6	DAT1	VNTR	reces	0,008	0,038	100	0,014
10	DBH	C-1021T	reces	0,014	0,055	N/A	N/A
8	DBH	G444A	reces	0,018	0,055	N/A	N/A
7	DBH	G444A	alel	0,028	0,056	33.4	N/A

Tabulka č.13: Korigované hodnoty P na pohlaví. Žlutá: polymorfismy mající signifikantní hodnotu výsledku. N/A: non-aplicable, výpočet nelze provést, ve skupině nebyl detekován homozygot pro rizikovou alelu. Řazeno dle corr P .

4.5.6. Haplotypová analýza.

Pro polymorfismy G444A a C1603T v genu DBH, které se v univariátním modelu ukázaly jako asociované s ADHD, byla provedena logistická regrese pomocí níž lze zhodnotit synergicky působící syntenní polymorfismy. Jak je patrné z výsledků (tabulky č. 14,15,16 a obr. č. 12), relativní riziko pro kombinaci polymorfismů je vyšší než pro polymorfismy jednotlivé. Konkrétně riziko v přítomnosti 444A je 1,57-krát vyšší a alely 1603T vyšší 8,03-krát, zatímco v přítomnosti 444A a zároveň 1603T se riziko zvýšilo až na O.R. zhruba 15 v obou modelech. Znamená to, že efekt polymorfismů je aditivní. Široký konfidenční interval je dán relativně malým počtem individuí, které mají současně obě rizikové alely. Přesto je ale výsledek signifikantní.

- **Genotypový model**

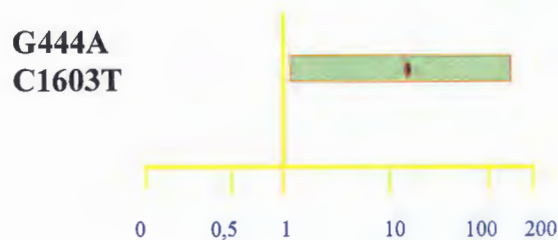
	P value	O.R.	95,0% C.I. pro O.R.	
			dolní	horní
<u>C1603T a G444A</u>	<u>0,010</u>	<u>14,97</u>	<u>1,918</u>	<u>116,75</u>

Tabulka č. 14: Logistická regrese pro G444A a C1603T v DBH – genotypový model. $P < 0,05$, riziko onemocnění 15 – krát vyšší

- **Alelický model.**

	P	O.R.	95,0% C.I. pro O.R.	
			dolní	horní
<u>C1603T a G444A</u>	<u>0,008</u>	<u>16,116</u>	<u>2,076</u>	<u>125,093</u>

Tabulka č. 15: Logistická regrese pro G444A a C1603T v DBH – alelický model. $P < 0,05$, riziko onemocnění 16 – krát vyšší



Obrázek č 12: Výsledky haplotypové analýzy. Tečka – podíl šancí O.R. Zeleně – C.I. 95%. Výsledky jsou signifikantní nepřesahuje-li hodnota C.I. 95 % hodnotu 1. Vysvětlivky na straně 44.

model	veličina	univariátní analýza G444A	univariátní analýza C1603T	haplotypová analýza G444A+C1603T
alelický	<i>P</i> value	2,78e-02	1,27e-03	0,008
	O.R.	1,57	8,03	16,116
	C.I 95%	1,049-2,308	1,811-35,580	2,076-125,093
recesivní	<i>P</i> value	1,84e-02	1,00e+00	0,010
	O.R.	2,80	1,15	14,965
	C.I 95%	1,178-6,653	0,023-58,684	1,918-116,756

Tabulka č. 16: Porovnání univariátní a haplotypové analýzy pro polymorfismy G444A a C1603T v DBH.
Vysvětlivky na straně 44. Bíle – genotypový model pro haplotypovou analýzu.

5. Diskuse

ADHD (porucha pozornosti / hyperkinetický syndrom) je multifaktoriální onemocnění podmíněné různými kandidátními geny. V současné době je známo více než třicet dopaminergních, noradrenergických, serotoninergních a GABA-ergních genů, které mají vliv na vznik a vývoj ADHD. Pouze výzkum některých z nich (DRD4, DAT1, DRD5, DBH, 5-HTT, HTR1B, SNAP25) přinesl konzistentní výsledky podporující dědičnost ADHD syndromů (Faraone, 2005; Paclt et al., 2005). Některé kandidátní geny acetylcholinových a glutamátových receptorů asociaci s ADHD nevykázaly a výsledky výzkumu ostatních genů (DRD2, DRD3, MAO, ADR2A, GABAA3, GABAB3) jsou stále nejasné. Studium těchto a dalších genů by mohlo pomoci vysvětlit polygenní etiologii některých podskupin ADHD a etiologii ADHD s komorbidními poruchami. Na základě dosavadních znalostí problematiky ADHD byly pro tento projekt vytipovány kandidátní geny DRD2, DRD3, DAT1, DBH a 5-HTT, které souvisí s biologickými procesy neurotransmiterových systémů ovlivňující hyperkinetický syndrom.

Ke studiu polymorfismů v kandidátních genech v populaci ADHD dětí byla zvolena strategie asociační analýzy, která je přímo zaměřena na testování vztahu mezi konkrétní alelou, genotypem nebo haplotypem (souborem úzce vázaných genotypů) a onemocněním. Pomocí této metody lze identifikovat i polymorfismy s malým příspěvkem k riziku choroby a nemalou výhodou je i fakt, že není zapotřebí provádět pracné rodokmenové studie a sbírat vzorky od příbuzných. Asociační studie má charakter "case-control" (případ-kontrola), kdy je porovnáváno relativní zastoupení určitého polymorfismu mezi skupinami, z nichž jedna dané onemocnění vykazuje (ADHD), zatímco druhá nikoli. Pokud je i při zachování zásad správného výběru obou skupin a po statistickém odfiltrování falešně pozitivních výsledků nalezena asociace mezi zkoumanou genetickou variantou a onemocněním, lze vyslovit předpoklad, že tato alela nějakým způsobem s onemocněním souvisí, nebo je ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium, LD) se skutečnou kauzální alelou a slouží tedy víceméně jako její marker. Z principu této metody je zřejmé i její omezení (LD, vliv stratifikace) a tak je obecně nutné konkrétní výsledek replikovat alespoň v jedné nezávislé studii, aby byl považován za biologicky významný.

Jeden z prvních a zásadních úkolů projektu, který jsme museli pro přínos validních výsledků splnit, bylo sestavení dostatečně velkého souboru pacientů a skupiny kontrol.

Pacienti byli posuzováni dle kritérií The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition, která jsou novější a v současné době používanější, obzvláště ve velkých a dobře navržených mezinárodních projektech. To je výhodné při porovnávání získaných dat s výsledky jiných vědeckých skupin, např. při sledování rozdílů mezi odlišným etnickým původem jedinců. Dosavadní analýzy genetické komponenty ADHD (multifaktoriálních onemocnění obecně) potvrzují předpoklad, že pro populace různých etnik se skupiny odpovědných genů do určité míry liší a význam jednotlivých variant má v různých populacích jinou míru relevance pro výsledný fenotyp. Aby měly statistické výsledky kvalitní výpovědní hodnotu, byl zvolen dostačující počet pacientů i kontrol (sto a sto dětí). Děti s ADHD byly vybírány ve věkovém rozmezí 4 – 11 let, vzhledem k tomu, že u dětí mladších 4 let a starších 11 let nastávají symptomatické změny, což může přinášet řadu diagnostických problémů (Paclt et al., 2005). Takto sestavený soubor ADHD pacientů může být též vhodný k dalším studiím biologických markerů (měření hladin DBH v séru, hladin melatoninu, vyšetření katecholaminů v moči) a volumetrickému měření asymetrie globus pallidus a caudatum. Některé biochemické periferní parametry se totiž v průběhu vývoje mění, což by mohlo zkreslit získané informace. Např. aktivita DBH kontinuálně vzrůstá s výjimkou pubertálního období (Paclt et al., 2004), hladina HVA v CSF s věkem klesá, stejně jako hustota dopaminových receptorů (Volkow et al., 1996), pokles serotoninu v krvi byl rovněž pozorován (Ritvo et. al., 1971). Změny některých biochemických markerů byly též popsány v rámci některých podskupin ADHD a u některých ADHD komorbidních onemocnění.

Kontrolní skupina nebyla sestavována dle náhodného výběru či převzata, jako je tomu v mnoha jiných studiích (což může být i jeden z důvodů, proč jsou výsledky v jednotlivých publikacích rozporuplné), ale byla přesně definována. To znamená, že děti zavzaté do skupiny kontrol byly podrobeny stejným testům jako ADHD pacienti, avšak vybrány pouze ty, u nichž byly příznaky hyperkinetického syndromu vyloučeny. Část kontrolní skupiny byla získána na základních školách, kde se odběr vzorků prováděl neinvazivní metodou - odběrem slin do speciálních nádob určených pro izolaci DNA ze slin. Pro dostatečný výtěžek čisté DNA se muselo dbát na to, aby děti alespoň 10 minut před odběrem slin nejedly. Problém nastal pouze u dětí z prvních tříd, které neuměly „naplivat“ dostatečné množství slin do nádoby. Vzorky od mladších dětí byly proto získány za laskavé spolupráce MUDr. Pacltové v soukromé ordinaci pro děti a dorost na Praze 4. Vzhledem k tomu, že se ADHD vyskytuje častěji u chlapců než u dívek, je počet chlapců ve skupině pacientů výrazně vyšší než počet dívek. V kontrolní skupině chlapci též převyšovali nad dívkami nikoliv však ve stejném

poměru (zde poměr bližší běžné populaci), proto závěrečná statistická analýza zahrnovala i korekci na pohlaví. Etnický původ jedinců zůstal v obou skupinách stejný.

Pro molekulárně-genetickou analýzu byly nejprve vybrány a pořízeny vhodné primery pro jednotlivé polymorfismy a optimalizována metodika. Nejlépe se pro RFLP i VNTR osvědčila strategie: PCR, štěpení (u RFLP) a následná elektroforetická separace ve 2% agarózovém gelu.

Již při prvním porovnání údajů vyplývajících z molekulárně-genetické analýzy (uvedených v tabulkách s pozorovanými počty genotypů) je patrné, že počet homozygotů pro rizikové alely (genotyp 3) ve všech případech kromě DRD3 převažuje u ADHD pacientů nad počtem tohoto genotypu v kontrolní skupině, zatímco u nerizikového genotypu 1 lze pozorovat opačnou situaci. Dále je patrné, že při analýze nebyl v kontrolní skupině detekován jediný homozygot rizikového genotypu 3 v DBH genu pro polymorfismy C-1021T, G910T, C1603T a C1912T, což by mohlo nasvědčovat tomu, že C-1021T, G910T, C1603T a C1912T jsou ve vazebné nerovnováze. Gen pro DBH je rozdělen do několika haplobloků, v nichž prakticky nedochází k rekombinaci a které kosegregují vcelku nerozdělené. Polymorfismy C-1021T, G910T, C1603T a C1912T jsou ale v genu lokalizovány v různých částech (konkrétně v promotorové oblasti, exonu 5, 11 a 12) a nespádají do stejného haplobloku. Je tedy možné, že může existovat určitá spojitost v přenosu některých haplobloků. Statistickou významnost lze v genotypu 3 pozorovat též u polymorfismu TaqI (A1/A2) v DRD2, kde se objevil v porovnání s ostatními polymorfismy výrazný rozdíl počtu rizikových homozygotů (2 v kontrolní skupině vs 36 u ADHD pacientů), což potvrzuje výsledky již dříve publikovaných studií, např. nedávné asociační studie Šerý et al., 2006.

Kvalita analytické části bývá prověřována testováním, zda jsou kontroly v Hardy-Weinbergově rovnováze (HWE). Kdyby HWE nesplňoval ani jeden polymorfismus, či pouze některé ano a některé ne, nemá sledování HWE výpovědní hodnotu. Ale v naší studii 10 polymorfismů z 11 podmínku HWE splňovalo, zatímco pouze polymorfismus Ser9Gly v DRD3 v HWE neležel ($P=0,0057$). Avšak protože soubor kontrolních jedinců nebyl vybrán náhodně, není kritérium splnění HWE rozhodující pro vyřazení polymorfismu ze studia. Sledování HWE nám spíše přináší informaci o tom, zda se zastoupení genotypů mezi generacemi mění. Výsledky molekulárně-genetické analýzy polymorfismu Ser9Gly byly přesto znovu zrevidovány a odchylka od HWE opět potvrzena. Další možná nezávislá kontrola metodologie je porovnání s údaji v HapMap databázi (www.hapmap.org) v populaci evropského původu (CEU). Obdobně jako u HWE, kdyby získaná data nekorigovala s údaji v databázi, či pouze některá ano a některá ne, nemá srovnání smysl, avšak naše výsledky byly

srovnatelné s HapMap databází ve všech případech včetně polymorfismu Ser9Gly v DRD3. Zajímavé je, že tento polymorfismus nevykazoval HWE ani ve vzorku populace evropského původu ($P=0,010$). Je tedy možné, že frekvence alel a zastoupení genotypů se mezi generacemi mění. V populaci může docházet k určité selekci např. asortativními sňatky, kdy se vyhledávají partneři s podobnými vlastnostmi (např. na základě společných povahových rysů, hudebního talentu, fyzických vlastností). Je tedy porušen princip náhodného párování jehož následkem je zvyšování podílu homozygotů na úkor heterozygotů. Též nelze vyloučit, že jedinci s určitou alelou (kombinací alel) jsou méně komunikativní, hůře navazují vztahy a nežijí často rodinným životem a nemají potomky. Mají tedy nižší reprodukční fitness (reprodukční zdatnost). Dochází tak opět k odchylce od HWE.

Z výpočtů O.R. pro dva modely vyplynulo následující. Dle alelického modelu, kdy rizikový genotyp je pouze nosičství dané alely, vyšly signifikantní ($P<0,05$) polymorfismy TaqI v DRD2 ($P=3,735e-18$; O.R.=7,5), VNTR 20-23 bp v 5-HTT ($P=1,370e-06$; O.R.=2,698), VNTR 40 bp v DAT1 ($P=0,03084$; O.R.=1,640), G444A v DBH ($P=0,028$; O.R.=1,556) a C1603T v DBH ($P=0,00127$; O.R.=8,027). Po korekci na mnohočetné testování byl vyloučen polymorfismus G444A v DBH ($P=0,056$; O.R.=1,556) a C1603T v DBH nespůlnil podmínky power analýzy. Korekce na pohlaví nevyloučila žádný další polymorfismus. Nosiči jedné nebo dvou rizikových alel pro zbývající polymorfismy mají tedy zvýšené riziko onemocnění v přítomnosti alely 10 v DAT1 1,6 krát, alely 1 v 5-HTT 2,7 krát a alely A1 v DRD2 7,5 krát. U modelu recesivního, kdy se předpokládá, že rizikový genotyp je homozygotní stav, byly detekovány polymorfismy TaqI v DRD2 ($P=1,833e-13$; O.R.=54,75), VNTR 20-23 bp v 5-HTT ($P=7,201e-06$; O.R.=6,692), VNTR 40 bp v DAT1 ($P=0,00750$; O.R.=6,622), G444A v DBH ($P=0,01838$; O.R.=2,8), C-1021T v DBH ($P=0,01366$; O.R.=13,71) a C1603T v DBH ($P=0,00098$; O.R.=1,152) jako signifikantní. Po korekci na mnohočetné testování byly vyloučeny polymorfismy G444A v DBH ($P=0,055$; O.R.=2,8), C-1021T v DBH ($P=0,055$; O.R.=13,71) a C1603T v DBH ($P=1,00$; O.R.=1,152). Riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u homozygotů pro polymorfni alely v genech DRD2 (54 krát), 5-HTT (6,7 krát) a DAT1 (6,6 krát). V těchto genech se riziko onemocnění s dvojitým počtem rizikových alel pouze nezdvójnasobilo, ale potencovalo v DRD2 dokonce 7,3 krát (ze 7,5 na 54,8). V tomto případě je velmi široký konfidenční interval, který je dán relativně malým počtem individuí majících současně obě rizikové alely. Široký C.I. naznačuje velkou nejistotu výsledku. Avšak v power analýze, kdy pro arbitrární hodnotu svědčí výsledek alespoň 80%, pro DRD2 platilo power = 100%. V případě hodnoty power < 80% by bylo nutné rozšířit soubor pacientů.

U pacientů s ADHD byla zaznamenána snížená aktivita DBH v séru a v moči (Bowden et al., 1988; Rogeness et al., 1989a,b; Paclt et al., 1990; Gabel et al., 1993; Galvin et al., 1995, 1997; Comings et al., 1996, 1999; Paclt et al., 1997). V mnoha studiích se prokázala asociace mezi alelickými variacemi v DBH genu a biochemickými markery (enzymatickou aktivitou DBH v séru a hladinou DBH proteinu v CSF). V této souvislosti byly popsány polymorfismy G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del a TaqI, které byly sledovány i v naší studii. Test asociace vyšel v univariálním modelu pro polymorfismy G444A a C1603T, u nichž byla provedena logistická regrese. Regresí se zjistilo, že relativní riziko pro kombinaci polymorfismů je vyšší než pro polymorfismy jednotlivé (G444A samostatně O.R.= 1,6 – 1,6 krát větší riziko onemocnění při výskytu této alely; C1603T samostatně O.R.= 8,03 – 8 krát riziko větší; oba společně O.R.= 14,965 – 15 krát riziko větší). Znamená to, že efekt polymorfismů je aditivní.

Z výsledků této studie tedy vyplynuly geny DRD2, 5-HTT, DAT1 a DBH jako asociované s ADHD. Naše data tak potvrdila výsledky některých předešlých asociačních a rodinných studií (viz kapitola Teoretický úvod), ale také studií in vitro a in vivo. Např. Duan et al., 2003 zjistili, že polymorfismus TaqI v DRD2 je v silné vazebné nerovnováze se SNP C957T, který v in vitro studii vykazoval 50% pokles translační aktivity v přítomnosti alely 957T, pravděpodobně díky snížené stabilitě mRNA. Hirvon et al., 2005 při experimentech in vivo pozorovali výrazné ovlivnění vazebného potenciálu striatálních DRD2 receptorů polymorfismem C957T. Je tedy pravděpodobné, že i polymorfismus TaqI (nebo ještě další v LD) přispívá k poklesu translace i k nižší dostupnosti receptorů DRD2. U DAT1 byla souvislost mezi alelou 10 a zvýšenou transkripční aktivitou detekována v experimentech in vitro (Michelhaugh et al., 2001 v preparátech získaných ze substantia nigra; Fuke et al., 2001 v COS buňkách) i in vivo (Mill et al., 2000 - zvýšená hladina mRNA v mozečku a spánkovém laloku) viz kapitola Teoretický úvod. Také alela *l* v 5-HTT se projevuje vyšší transkripční aktivitou. Heils et al., 1997 pozorovali 3x vyšší transkripční aktivitu v konstruktu obsahujícím promotor s *l* alelou než s alelou *s*. V lymfoblastoidní buněčné linii *ll* genotyp vykazoval vyšší hladinu SERT (Lesch et al., 1996) a zvýšená exprese 5-HTT genu a transportní aktivity proteinu v souvislosti s *ll* genotypem byla pozorována i v případě dalších periferních tkání (Eddahibi et al., 2001). A konečně u DBH Zabetian et al., 2001 prokázali, že snížená exprese genu je silně asociována s alelou v promotorové oblasti -1021T, G444A může měnit efektivitu sestřihu a tím množství maturované mRNA a finálního DBH proteinu (Kobayashi et al., 1989) a u G910T SNP 910T alela podmiňuje 13 krát nižší homospecifickou aktivitu oproti nerizikové alele 910G (Ishii et al., 1991).

V devadesátých letech bylo dosaženo výrazného pokroku při studiu biologických aspektů ADHD. Byly odkryty změny (funkční i strukturální) ve frontálně-striální oblasti a v některých dalších oblastech (vermis cerebelli) (Castellanos et al., 1994; Castellanos, 1997). Je pravděpodobné, že korelace genetických a biochemických markerů může přinést další přesnější interpretaci při studiu etiopatogeneze hyperkinetického syndromu a poruch chování v dětském věku. Další možnosti při studiu etiologie ADHD jsou studie a korelace farmakogenetických a biochemických markerů. Hypoteticky některé podskupiny ADHD by mohly být identifikovány korelací biochemických, behaviorálních, farmakogenetických charakteristik a některých kandidátních genů. Problém participace jednotlivých transmitterových systémů v etiologii ADHD může být studován pomocí léků užívaných v terapii ADHD se specifickým mechanismem účinku. Jsou to dopaminergní léky (stimulancia), noradrenergní lék (atomoxetin) a serotoninergní léky (inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, především citalopram, který je nejvíce specifický). A naopak diferenciací určité skupiny pomocí kandidátních genů může pomoci predikovat nonrespondéry na určité léky a přispět k výběru vhodného psychofarmaka.

S nástupem nových technologií se stává realizovatelná celogenomová asociační analýza např. použitím čipů, které umožňují současně testovat desítky až stovky tisíc SNP. Avšak na druhou stranu, s množstvím testovaných polymorfismů prudce narůstá riziko pozitivních pozorování a je třeba veliké opatrnosti při interpretaci výsledků těchto studií. V neposlední řadě je nutné brát v úvahu i finanční stránku analýzy, která je v tomto případě zatím nepříznivá.

Rozpoznání účasti transmitterových systémů může být v budoucnosti nápomocné i z prognostického hlediska, popřípadě získané znalosti mohou být využity v genetickém poradenství. Neméně důležitým aspektem je pochopení polygenní etiologie komorbidních poruch u ADHD. Proto je potřebné odhalit co největší počet genů, identifikovat jejich mutace nebo funkční polymorfismy a studovat rozsah jejich působení na vznik a klinickou heterogenitu ADHD. Výzkum dalších genů, jejichž výsledné produkty jsou zapojeny do biologických procesů souvisejících s problematikou ADHD, by tedy měl být v budoucnu prováděn pro lepší pochopení a porozumění tohoto onemocnění.

7. Závěr

Tato práce je zaměřena na problematiku hyperkinetického syndromu, který představuje závažný sociálně-medicínský problém. Postihuje 3-6% dětské populace a je klinicky charakterizován nepozorností, impulzivitou a hyperaktivitou. Je to onemocnění multifaktoriální a geneticky heterogenní a v současné době je známo více než 30 genů s možnou účastí na vzniku a vývoji onemocnění. Jednotlivé alely těchto genů mohou být v populaci relativně časté, protože nepředstavují klasické mutace, ale polymorfismy, které jsou příčinou arteficiální aktivity produktu.

Studium jednotlivých transmitterových systémů, které jsou do patogeneze ADHD zapojeny, a poznání vlivu genetického podkladu na jejich funkční změny může v budoucnosti pomoci při volbě vhodného psychofarmaka vzhledem k tomu, že v léčbě hyperkinetické poruchy se uplatňují látky s různým mechanismem účinku. Ke studiu byly proto vybrány geny systému dopaminergního (DRD2, DRD3 a DAT1), noradrenergního (DBH) a serotoninergního (5-HTT) u nichž byla provedena molekulárně-genetická analýza 11 polymorfismů se základní strategií založenou na asociačním studiu „případ-kontrola“. Přítomnost rizikových alel byla porovnána v souboru 100 dětí s ADHD a v kontrolní skupině 100 jedinců, u nichž byly příznaky ADHD vyloučeny testem Connersové. Výsledky našeho výzkumu svědčí pro asociaci genů DRD2, 5-HTT, DAT1 a DBH s ADHD. Konkrétně po korekci výsledků na mnohočetné testování, korekci na pohlaví a po provedení power-analýzy platí:

- 1) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u nosičů rizikové alely TaqI A1 v genu *DRD2* (7,5-krát), 1 alely v *5-HTT* (2,7-krát) a alely 10 v *DAT1* (1,6-krát)
- 2) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u homozygotů pro výše uvedené alely v genech *DRD2* (54-krát), *5-HTT* (6,7-krát) a *DAT1* (6,6-krát)
- 3) riziko ADHD je signifikantně zvýšeno u nosičů polymorfní alely *DBH +444A*, kteří jsou současně nosiči polymorfní alely *DBH +1603T* (14,9-krát).

Genetické přístupy ve výzkumu ADHD mají zásadní význam nejen teoretický, ale také praktický. Otevírají perspektivu volby farmaka podle genetické etiologie. Farmakologický přístup je v současnosti nejúčinnější formou léčby a jeho včasná aplikace brání rozvoji sekundárních poruch.

LITERATURA:

1. Abe M, Honda K, Hoshino Y, Nieu S. The relationship between plasma MHPG concentration and the therapeutic effect of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosciences*. 1994; 20(4): 197-201.
2. Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S. A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 5;93(5):1945-9.
3. Achenbach TM & Edelbrock CS. *Manual for the Child Behaviour Checklist*. Burlington: University of Vermont. 1983.
4. Amara SG, Kuhar MJ. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 73-93.
5. Anderson JS, Williams S, McGee R, Silva PA. DSM-III-R disorders in preadolescent children: Prevalence in a large sample from the general population. *Archives of General Psychiatry*. 1987; 4:69-76.
6. Barkley RA. *ADHD and the nature of self-control*. New York: Guilford Press.
7. Barr CL, Wigg KG, Wu J, Zai C, Bloom S, Tannock R, Roberts W, Malone M, Schachar R, Kennedy JL. Linkage study of two polymorphisms at the dopamine D3 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet*. 2000 Feb 7;96(1):114-7.
8. Basile VS, Masellis M, Badri F, Paterson AD, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, Macciardi F, Kennedy JL. Association of the MscI polymorphism of the dopamine D3 receptor gene with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Jul;21(1):17-27.
9. Berquin PC, Giedd JN, Jacobsen LK, Hamburger SD, Krain AL, Rapoport JL, Castellanos FX. Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. *Neurology*. 1998 Apr;50(4):1087-93.
10. Beitchman JH, Davidge KM, Kennedy JL, Atkinson L, Lee V, Shapiro S, Douglas L. The serotonin transporter gene in aggressive children with and without ADHD and nonaggressive matched controls. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1008:248-51.
11. Bhaduri N, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Singh M, Mukhopadhyay KK. Analysis of polymorphisms in the dopamine beta hydroxylase gene: association with attention deficit hyperactivity disorder in Indian children. *Indian Pediatr*. 2005 Feb;42(2):123-9.
12. Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Knee D, Tsuang MT. Family-genetic and psychosocial risk factors in DSM-III attention deficit disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1990; 29(4):526-33.
13. Biederman J, Newcorn J, Sprich S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am J Psychiatry*. 1991; 148(5):564-77.
14. Biederman J, Mick E, Faraone SV, Braaten E, Doyle A, Spencer T, Wilens TE, Frazier E, Johnson MA. Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. *Am J Psychiatry*. 2002; 159:36-42.
15. Bondy B, Erfurth A, de Jonge S, Kruger M, Meyer H. Possible association of the short allele of the serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) with violent suicide. *Mol Psychiatry*. 2000 Mar;5(2):193-5.
16. Bowden CL, Deutsch CK, Swanson JM. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and platelet monoamine oxidase in attention deficit disorder and conduct disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1988; 27(2):171-4.
17. Bradley CC, Blakely RD. Alternative splicing of the human serotonin transporter gene. *J Neurochem*. 1997 Oct;69(4):1356-67.

18. Brett P, Robertson M, Gurling H, Curtis D. Failure to find linkage and increased homozygosity for the dopamine D3 receptor gene in Tourette's syndrome. *Lancet*. 1993 May 8;341(8854):1225. No abstract available.
19. Castellanos FX, Giedd JN, Eckburg P et al. Quantitative morphology of the caudate nucleus in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J of Psychiatry*. 1994; 151:1791-1796.
20. Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Vauss YC, Snell JW, Lange N, Kaysen D, Krain AL, Ritchie GF, Rajapakse JC, Rapoport JL. Quantitative brain Magnetic Resonance Imaging in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 1996; 53: 607-616.
21. Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CI, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN, Rapoport JL. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Medical Association*. 2002; 288:14:1740-1748.
22. Comings, D. E., Muhleman, D., Dietz, G., Shahbahrani, B., Tast, D., Kovacs, B. W.: The dopamine D2 receptor gene is a modifier of the expression of the Tourette syndrome (Gts) and ADHD gene. *Am J Hum Genet* 1990; 46. (Abstract).
23. Comings, D. E., Comings, B. G., Muhleman, D., Dietz, G., Shahbahrani, B., Tast, D., Knell, E., Kocsis, P., Baumgarten, R., Kovacs, B. W., Levy, D. L., Smith, M., Kane, J. M., Lieberman, J. A., Klein, D. N., MacMurray, J., Tosk, J., Sverd, J., Gysin, R., Flanagan, S.: The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *J. Am. Med. Assn.* 1991; 266: 1793-1800.
24. Comings DE, Muhleman D, Dietz G, Dino M, LeGro R, Gade R. Association between Tourette's syndrome and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *Lancet*. 1993 Apr 3;341(8849):906.
25. Comings DE, Wu S, Chiu C, Ring RH, Gade R, Ahn C. et al. Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: The additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes - DRD2, D beta H, and DAT1. *Am-J-Med-Genet-Neuropsychiatr-Genet*. 1996; 67(3):264-288.
26. Comings, D. Genetics of ADHD, conference IBC, April 28 - 29, Boston 1997.
27. Comings DE, Gade Andavolu R, Gonzales N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrom subjects. *Clin. Genet*. 1999; 55(3):160-172.
28. Cook EH Jr, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL. Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 993-998.
29. Courtet P, Baud P, Abbar M, Boulenger JP, Castelnau D, Mouthon D, Malafosse A, Buresi C. Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter gene. *Mol Psychiatry*. 2001 May; 6(3):338-41.
30. Courvoisier H, Hooper SR, Fine C, Kwock L, Castillo M. Neurometabolic Functioning and Neuropsychological Correlates in Children With ADHD-H: Preliminary Findings. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2004; 16:63-69.
31. Curran S, Purcell S, Craig I, Asherson P, Sham P. The serotonin transporter gene as a QTL for ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Apr 5;134(1):42-7.
32. Dal Toso R, Sommer B, Ewart M, Herb A, Prichett DB, Bach A, Shivers DB, Seeburg PH. The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*. 1989; 8:4025-4034.

33. Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry*. 1999; 4(2):192-6.
34. Delbruck SJ, Wendel B, Grunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq MA, Berrettini WH, Hoehe MR. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;79(3-4):214-20.
35. Dohlman HG, Caron MG, Deblasi A, Frielle T, Lefkowitz JL. A role of extracellular disulfide bonded cysteines in the ligand binding function of the β_2 adrenergic receptor. *Biochemistry* 1990; 29:2335-2342.
36. Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 1999 Dec 18-25;354(9196):2132-3.
37. Dresel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbaumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K. Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [^{99m}Tc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med*. 2000 Oct;27(10):1518-24.
38. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics*. 2003; 12(3): 205-216.
39. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1141-50.
40. Ekman A, Nissbrandt H, Heilig M, Dijkstra D, Eriksson E. Central administration of dopamine D3 receptor antisense to rat: effects on locomotion, dopamine release and [³H]spiperone binding. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998 Sep;358(3):342-50.
41. Faraone SV, Biederman J, Krifcher B, Lehmann B, Keenan K, Norman D, Seidman LJ, Kolodny R, Kraus I, Perrin J, Chen, WJ. Evidence for the independent familial transmission of attention deficit hyperactivity disorder and learning disabilities Results from a family genetic study. *American Journal of Psychiatry*. 1993; 150: 891-895.
42. Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005; 57(11):1313-23.
43. Ford T, Goodman R, Meltzer H. The British Child and Adolescent Mental Health Survey 1999: the prevalence of DSM-IV disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2003; 42:1203-1211.
44. Fraser C. Site-directed mutagenesis of β adrenergic receptors. *J. Biol. Chem*. 1989; 264: 9266-9270.
45. Freedman LS, Ohuchi T, Goldstein M, Axelrod F, Fish I, Dancis J. Changes in human serum dopamine- β -hydroxylase activity with age. *Nature*. 1972; 236(5345):310-1.
46. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S: The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J*. 2001; 1(2):152-156.
47. Gabel S, Stadler J, Bjorn J, Shindlecker R, Bowden CL. Biodevelopmental aspects of conduct disorder in boys. *Child Psych. Hum. Dev*. 1993; 24(2):125-141.
48. Galvin M, TenEyck R, Shekhar A, Stilwell B, Fineberg N, Laite G, et al. Serum dopamine-beta-hydroxylase and maltreatment in psychiatrically hospitalized boys. *Child Abuse and Neglected*. 1995; 19(7):821-832.
49. Galvin M, Stilwell BM, Shekhar R, Kopta SM, Goldfarb SM. Maltreatment, conscience functioning and dopamine-beta-hydroxylase in emotionally disturbed boys. *Child Abuse and Neglected*. 1997; 21(1):83-92.
50. Gandelman KY, Harmon S, Todd RD, O'Malley KL. Analysis of the structure and expression of the human dopamine D2A receptor gene. *J Neurochem*. 1991 Mar;56(3):1024-9.

51. Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(2):243-6.
52. Gelernter J, Kranzler H, Lacobelle J. Population studies of polymorphisms at loci of neuropsychiatric interest (tryptophan hydroxylase (TPH), dopamine transporter protein (SLC6A3), D3 dopamine receptor (DRD3), apolipoprotein E (APOE), mu opioid receptor (OPRM1), and ciliary neurotrophic factor (CNTF)). *Genomics.* 1998 Sep 15;52(3):289-97.
53. Giedd JN, Castellanos FX, CaseyBJ, KozuchP, King AC, Hamburger SH, Rapoport JL. Quantitative morphology of the corpus callosum in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 1994; 151:665-669.
54. Gilger JW, Pennington BF, DeFries JC. A twin study of the etiology of comorbidity: attention-deficit hyperactivity disorder and dyslexia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1992 Mar;31(2):343-8.
55. Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 1993; 16: 299-321.
56. Giros B, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC. [Gene cloning of human dopaminergic D3 receptor and identification of its chromosome] *C R Acad Sci III.* 1990;311(13):501-8. French.
57. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996; 379: 606-612.
58. Hahn MK, Blakely RD. Gene organization and polymorphisms of monoamine transporters. Relationship to psychiatric and other complex diseases. In: Reith MEA (ed). *Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation*, 2nd adn. Pp 111-169. Humana Press: Totowa, 2002.
59. Hart HH. Measurement of right frontal lobe functioning and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychology.* 2001; 2: 1080.
60. Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhage F, Nothen M, Greenwood T, et al. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol Psychiatry.* 2003; 8(3):299-308.
61. Heils A, Mossner R, Lesch KP. The human serotonin transporter gene polymorphism--basic research and clinical implications. *J Neural Transm.* 1997;104(10):1005-14.
62. Herrmann N, Lanctot KL. From transmitters to treatment: the pharmacotherapy of behavioural disturbances in dementia. *Can J Psychiatry.* 1997 Jun;42 Suppl 1:51S-64S. Review.
63. Hirvonen M, Laakso A, Na gren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Molecular Psychiatry.* 2005; 10: 889.
64. Hynd GW, Semrud-Clikeman M, Lorys AR, Novey ES, Eliopoulos D, Lyytinen H. Corpus callosum morphology in attention deficit-hyperactivity disorder: morphometric analysis of MRI. *J Learn Disabil.* 1991 Mar;24(3):141-6.
65. Chang MY, Lee SH, Kim JH, Lee KH, Kim YS, Son H, Lee YS. Protein kinase C-mediated functional regulation of dopamine transporter is not achieved by direct phosphorylation of the dopamine transporter protein. *J Neurochem.* 2001; May;77(3):754-61.
66. Cheuk DKL, Li SYH, Wong V. No association between VNTR polymorphisms of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children. *Am. J. Med. Genet.* 2006; 141B: 123-125.

67. Inkster B, Muglia P, Jain U, Kennedy JL. Linkage disequilibrium analysis of the dopamine beta-hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet.* 2004; 14(2):117-20.
68. Ishii A, Kobayashi K, Kiuchi K, Nagatsu T. Expression of two forms of human dopamine-beta-hydroxylase in COS cells. *Neurosci Lett.* 1991; 125(1):25-8.
69. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol. Ther.* 1994; 64: 291-369.
70. Jensen PS, Martin BA, Cantwell DP. Comorbidity in ADHD: Implications for research, practice and DSM-IV. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry.* 1997; 36:1065-1079.
71. Jönsson, E., Sedvall, G., Brené, S., Gustavsson, J.P., Geijer, T., Terenius, L., Crocq, M.A., Lannfelt, L., Tylec, T., Sokoloff, P., Schwartz, J.C., Wiesel, F.-A.: Dopamine-related genes and their relationship to monoamine metabolites in CSF. *Biol. Psychiatry* 1996; 40: 1032-1043.
72. Kahn RS, Khoury J, Nichols WC, Lanphear BP. Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors. *J. Pediat.* 2003; 143: 104-110.
73. Kennedy JL, Billett EA, Macciardi FM, Verga M, Parsons TJ, Meltzer HY, Lieberman J, Buchanan JA. Association study of dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1995 Dec 18;60(6):558-62.
74. Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M, Craddock N. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Mol Psychiatry.* 2002;7(8):908-12.
75. Kirley A, Hawi Z, Daly G, McCarron M, Mullins C, Millar N, et al. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27(4):607-19.
76. Kobayashi K, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T. Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(3):1089-102.
77. Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett.* 2000 May 12;285(2):107-10.
78. Krebs MO, Sautel F, Bourdel MC, Sokoloff P, Schwartz JC, Olie JP, Loo H, Poirier MF. Dopamine D3 receptor gene variants and substance abuse in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 1998 Jul;3(4):337-41.
79. Kunugi H, Hattori M, Kato T, Tatsumi M, Sakai T, Sasaki T, Hirose T, Nanko S. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry.* 1997 Oct-Nov;2(6):457-62.
80. Kusaga A, Yamashita Y, Koeda T, Hiratani M, Kaneko M, Yamada S, Matsuishi T. Increased urine phenylethylamine after methylphenidate treatment in children with ADHD. *Ann Neurol.* 2002 Sep;52(3):372-4.
81. Lagos P, Scorza C, Monti JM, Jantos H, Reyes-Parada M, Silveira R, Ponzoni A. Effects of the D3 preferring dopamine agonist pramipexole on sleep and waking, locomotor activity and striatal dopamine release in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1998 May;8(2):113-20.
82. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.

83. Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I. Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997; 36(6):737-44.
84. Lewis DA, Hayes TL, Lund JS, Oeth KM. Dopamine and the neural circuitry of primate prefrontal cortex: implications for schizophrenia research. *Neuropsychopharmacology*. 1992; 6(2):127-34.
85. Martin N, Scourfield J, McGuffin P. Observer effects and heritability of childhood attention-deficit hyperactivity disorder symptoms. *Br J Psychiatry*. 2002;180:260-5.
86. Mash EJ, Dozois DJA.: Child psychopathology: A developmental system perspective. In: E. J. Mash and J. A. Barkley(Eds.): *Child psychopathology* (pp. 3-60), New York, Guilford Press, 1996.
87. Meador-Woodruff JH, Damask SP, Wang J, Haroutunian V, Davis KL, Watson SJ. Dopamine receptor mRNA expression in human striatum and neocortex. *Neuropsychopharmacology*. 1996 Jul;15(1):17-29.
88. Melikian HE, McDonald JK, Gu H, Rudnick G, Moore KR, Blakely RD. Human norepinephrine transporter. Biosynthetic studies using a site-directed polyclonal antibody. *J Biol Chem*. 1994 Apr 22;269(16):12290-7.
89. Melikian HE, Ramamoorthy S, Tate CG, Blakely RD. Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. *Mol Pharmacol*. 1996 Aug;50(2):266-76.
90. Michaelovsky E, Frisch A, Rockah R, Peleg L, Magal N, Shohat M, Weizman R. A novel allele in the promoter region of the human serotonin transporter gene. *Mol Psychiatry*. 1999 Jan;4(1):97-9.
91. Michelhaugh SK, Fiskerstrand C, Lovejoy E, Bannon MJ, Quinn JP. The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. *J Neurochem*. 2001 Dec;79(5):1033-8.
92. Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I: Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet*. 2002; 114(8):975-979.
93. Mill J, Asherson P, Craig I, D'Souza UM. Transient expression analysis of allelic variants of a VNTR in the dopamine transporter gene (DAT1). *BMC Genetics* 2005, 6:3
94. Missale C, Nasch SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological reviews*. January 1998 Jan; 78: 189-225
95. Mitchell RJ, Howlett S, Earl L, White NG, McComb J, Schanfield MS, Briceno I, Papiha SS, Osipova L, Livshits G, Leonard WR, Crawford MH. Distribution of the 3' VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene in world populations. *Hum Biol*. 2000 Apr;72(2):295-304.
96. Montmayeur JP, Berrelli E. Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D₂ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:3135-3139.
97. Muglia P, Jain U, Kennedy JL. A transmission disequilibrium test of the Ser9/Gly dopamine D3 receptor gene polymorphism in adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*. 2002 Mar 10;130(1-2):91-5.
98. Munden A, Arcelus J. *Poruchy pozornosti a hyperaktivita*. Praha : Portál, 2002. 119 s. ISBN 80-7178-625-X.
99. Mynett-Johnson L, Kealey C, Claffey E, Curtis D, Bouchier-Hayes L, Powell C, McKeon P. Multimarkerhaplotypes within the serotonin transporter gene suggest evidence of an association with bipolar disorder. *Am J Med Genet*. 2000 Dec 4;96(6):845-9.
100. Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry*. 2000 Jan;5(1):32-8.

- 101.Nanko S, Ueki A, Hattori M, Dai XY, Sasaki T, Fukuda R, Ikeda K, Kazamatsuri H. No allelic association between Parkinson's disease and dopamine D2, D3, and D4 receptor gene polymorphisms. *Am J Med Genet.* 1994 Dec 15;54(4):361-4.
- 102.Newhouse P, Tatro A, Naylor M, Quealey K, Delgado P. Alzheimer disease, serotonin systems, and tryptophan depletion. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2002;10(4):483-4.
- 103.Noble EP, Gottschalk LA, Fallon JH, Ritchie TL, Wu JC. D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *Am. J. Med. Genet.* 1997;74.
- 104.Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Klinická genetika.* Thompson and Thompson. 2001 by W.B. Saunders Company. Philadelphia. Translation Petr Goetz a kol. 2004.
- 105.O'Connor DT, Levine GL, Frigon RP. Homologous radio-immunoassay of human plasma dopamine-beta-hydroxylase: analysis of homospecific activity, circulating plasma pool and intergroup differences based on race, blood pressure and cardiac function. *J Hypertens.* 1983; 1(3):227-33.
- 106.O'Dowd BF. Structure of dopamine receptors. *J. Neurochem.* 1993; 60: 804-816.
- 107.Oxenstierna G, Edman G, Iselius L, Orelund L, Ross SB, Sedvall G. Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals-a genetic study. *J Psychiatr Res.* 1986; 20(1):19-29.
- 108.Paclt I, Florián J. *Psychofarmakoterapie dětského a dorostového věku.* 405.s. Grada. 1998. (dle Connersová, 1985, 1969).
- 109.Paclt I, Koudelová J. Dopamin-beta-hydroxylase in plasma of psychiatric patients. *Activ. nerv. super.* 1990; 32(1): 67.
- 110.Paclt I, Koudelová J. The activity of the dopamine-beta-hydroxylase (DBH) in an experiment in animals in norm and in humans suffering with special developmental dopaminergic disturbance. *Proceeding of the IBC International Conference on Dopaminergic Disorders; April 28-29, 1997; Boston, MA, USA.*
- 111.Paclt I, Uhlíková P, Florian J. Hyperkinetický syndrom v dětském věku. *Remedia.* 1999; 9(6):280-291.
- 112.Paclt I, Koudelova J. Changes of dopamine-beta-hydroxylase activity during ontogenesis in healthy subjects and in an experimental model (rats). *Physiol Res.* 2004; 53(6):661-7.
- 113.Paclt I, Koudelova J, Krepelova A, Uhlíkova P, Gazdikova M, Bauer P. Biochemical markers and genetic research of ADHD. *Neuri Endocrinol Lett.* 2005; 26(4):423-30.
- 114.Poeta LS, Rosa NF. Epidemiological study on symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder and behavior disorders in public schools of Florianopolis/SC using the EDAH. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004; 26:150 155
- 115.Quist JS, Kennedy JL. *Genetics of Childhood Disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The Serotonin System.* *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2001; 40(2):253-257.
- 116.Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry.* 1999 Aug 15;46(4):557-67.
- 117.Payton A, Holmes J, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, O'Donovan M, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study. *Am J Med Genet.* 2001 Jul 8;105(5):464-70.

118. Ramamoorthy S, Blakely RD. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):763-6.
119. Retz W, Rosler M, Supprian T, Retz-Junginger P, Thome J. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and violent behavior: relation to impulsiveness and ADHD-related psychopathology. *J Neural Transm*. 2003 May;110(5):561-72.
120. Ritvo E, Yuwiler A, Geller E, Plotkin S, Mason A, Saeger K. Maturation changes in blood serotonin levels and platelet counts. *Biochem Med*. 1971 Feb;5(1):90-6.
121. Rogness GA, Crawford L, McNamara A. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and preschool behaviour in children with conduct disorder. *Child Psychiatry Hum. De.* 1989a; 20(2):149-156.
122. Rogness GA, Maas JW, Javors MA, Macedo CA, Fischer C, Harris WR. Attention deficit disorder symptoms and urine catecholamines. *Psychiatry Res*. 1989b; 27(3):241-251.
123. Romain T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet*. 2002; 114(2):154-8.
124. Rowe DC, Van den Oord EJ, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Gilson M, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. The DRD2 TaqI polymorphism and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 1999 Nov;4(6):580-6.
125. Ruskin DN, Bergstrom DA, Tierney PL, Walters JR. Correlated multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: modulation by dopamine and the subthalamic nucleus. *Neuroscience*. 2003;117(2):427-38.
126. Sano A, Kondoh K, Kakimoto Y, Kondo I. A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene. *Hum Genet*. 1993 May;91(4):405-6.
127. Sery O, Drtilkova I, Theiner P, Pitelova R, Staif R, Znojil V, Lochman J, Didden W. Polymorphism of DRD2 gene and ADHD. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Apr 25;27(1-2):236-240 [Epub ahead of print]
128. Shaywitz BA, Cohen DJ, Bowers MB. CSF monamine metabolites in children with minimal brain dysfunction: Evidence for alteration of brain dopamine. *J Pediatrics* 1977; 90:67-71.
129. Sherman DK, McGue MK, Iacono WG. Twin concordance for attention deficit hyperactivity disorder: a comparison of teachers' and mothers' reports. *Am J Psychiatry*. 1997 Apr;154(4):532-5.
130. Scheres A, Oosterlaan J, Swanson J, Morein-Zamir S, Meiran N, Schut H, Vlasveld L, Sergeant JA. The effect of methylphenidate on three forms of response inhibition in boys with AD/HD. *J Abnorm Child Psychol*. 2003;31(1):105-20.
131. Silberstein RB, Farrow M, Levy F, Pipingas A, Hay DA, Jarman FC. Functional brain electrical activity mapping in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Dec;55(12):1105-12.
132. Simonoff E, Pickles A, Hervas A, Silberg JL, Rutter M, Eaves L. Genetic influences on childhood hyperactivity: contrast effects imply parental rating bias, not sibling interaction. *Psychological Medicine*. 1998; 28:825-837.[
133. Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, et al. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003; 119(1):77-85.
134. Snyder LA, Roberts JL, Sealfon SC. Alternative transcripts of the rat and human dopamine D₃ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1991;180:1031-1035.
135. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):146-51.

136. Spano PF, Govoni S, Trabucchi M. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1978; 19:155-165.
137. Spencer, T., Biederman, J., Wilens, T., Harding, M., O'Donnell, D., Griffin, S.: Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 1996; 35: 409-432.
138. Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2000 Nov;39(11):1432-7.
139. Steen VM, Lovlie R, MacEwan T, McCreadie RG. Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry.* 1997 Mar;2(2):139-45.
140. Suzuki H, Shimohira M, Iwakawa Y, Nagatsu T. Developmental change of dopamine beta-hydroxylase activity in cerebrospinal fluid of epileptic and non-epileptic children. *J Neural Transm Gen Sect.* 1990; 80(3):225-30.
141. Tannock R. Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiatry.* 1998; 39(1):65-99.
142. Todd RD, Lobos EA. Mutation screening of the dopamine D2 receptor gene in attention-deficit hyperactivity disorder subtypes: preliminary report of a research strategy. *Am J Med Genet.* 2002 Jan 8;114(1):34-41.
143. Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics.* 1992 Dec;14(4):1104-6.
144. Volkow ND, Ding Y, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Smith G, Fields SD, Gur R. Dopamine Transporters Decrease with Age. *The Journal of Nuclear Medicine.* 1996; 37(4):554-559.
145. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Fifford A, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N. Prediction of Reinforcing Responses to Psychostimulants in Humans by Brain Dopamine D2 Receptor Levels. *Am J. Psychiatry.* 1999; 156:1440-1443.
146. Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL et al. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1767-1776.
147. Weinshilboum RM. Serum dopamine beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev.* 1978; 30(2):133-66.
148. Weinshilboum R, Axelrod J. Serum dopamine- -hydroxylase: decrease after chemical sympathectomy. *Science.* 1971; 173(4000):931-4.
149. Weinshilboum RM, Raymond FA, Elveback LR, Weidman WH. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science.* 1973; 181(103):943-5.
150. Wigg K, Zai G, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, et al. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine Beta-hydroxylase. *Am J Psychiatry.* 2002; 159(6):1046-8.
151. Willeit M, Stastny J, Pirker W, Praschak-Rieder N, Neumeister A, Asenbaum S, Tauscher J, Fuchs K, Sieghart W, Hornik K, Aschauer HN, Brucke T, Kasper S. No evidence for in vivo regulation of midbrain serotonin transporter availability by serotonin transporter promoter gene polymorphism. *Biol Psychiatry.* 2001 Jul 1;50(1):8-12.
152. Yasong D, Linyan S, Xuerong L. Measurement of serum catecholamines in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Chin. J. Psychiatry,* 1998; 31(1):30-33.

153. Yeo R, Hill D, Campbell RA, Vilig J, Petropoulos H, Hart B, Zamora L, Brooks WM. Proton magnetic resonance spectroscopy investigation of the right frontal lobe in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psych.* 2003; 42(3): 303-310.
154. Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, et al. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(2):515-22.
155. Zametkin AJ, Nordahl TE, Gross M, King AC, Semple WE, Rumsey J, Hamburger S, Cohen RM. Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset. *N Engl J Med.* 1990 Nov 15;323(20):1361-6.
156. Zametkin AJ, Liebenauer LL, Fitzgerald GA, King AC, Minkunas DV, Herscovitch P, Yamada EM, Cohen RM. Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1993 May;50(5):333-40.
157. Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. [Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children] [Article in Chinese] *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2004; 36(3):290-3.
158. Ziegler MG, Lake CR, Kopin IJ. Plasma noradrenaline increases with age. *Nature.* 1976; 261(5558):333-5.
159. Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Sivasli E, Tutkun H, Savas HA, Herken H. Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology.* 2002;45(4):176-81.

8. Přílohy

8.1. Publikace

1. Kopeckova M, Paclt I, Goetz P. Polymorphisms and low plasma activity of dopamine-beta-hydroxylase in ADHD children. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 Dec; 27(6):748-54.
2. Paclt I., Koudelová J., Křepelová, A., Uhlíková P., Bauer, P., Gazdíková M.: Biochemical markers and genetic research of ADHD. *Neuroendocrinological letters.* 2005; Aug;26(4):423-30.
3. Kopeckova M, Paclt I, Goetz P. Polymorphisms of dopamine-beta-hydroxylase in ADHD children. *Folia Biol (Praha).* 2006;52(6):194-201.

Polymorphisms and low plasma activity of Dopamine-beta-hydroxylase in ADHD children

Marta KOPEČKOVÁ¹, Ivo PACLT² & Petr GOETZ¹

¹ Institute of Biology and Medical Genetics, 2nd School of Medicine, Charles University, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

² Department of Psychiatry, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Mgr. Marta Kopečková
Institute of Biology and Medical Genetics
University Hospital Motol, V Úvalu 84
150 06 Prague 5, Czech Republic
PHONE: +420 224 433 521
FAX: +420 224 433 520
EMAIL: marta.kopeckova@seznam.cz

Submitted: July 29, 2006

Accepted: September 15, 2006

Key words: dopamine-beta-hydroxylase; plasma activity; ADHD; polymorphism; G444A; G910T; C1603T; C-1021T; 5'-ins/del; TaqI

Neuroendocrinol Lett 2006; 27(6):748-754 PMID: 17187001 NEL270606A26 © Neuroendocrinology Letters www.nel.edu

Abstract

Attention-deficit Hyperactivity disorder (ADHD) is a multifactorial disorder clinically characterized by inattentiveness, impulsivity and hyperactivity. The occurrence of this disorder is between 3 and 6% of the children population, with boys predominating over girls at a ratio of 3:1 or more. The research of some candidate genes (DRD4, DAT, DRD5, DBH, 5HTT, HTR1B and SNAP25) brought consistent results confirming the heredity of ADHD syndromes. Dopamine-beta-hydroxylase (DBH) is an enzyme responsible for the conversion of dopamine into noradrenaline. Alteration of the dopamine/noradrenaline levels can result in hyperactivity. The DBH protein is released in response to stimulation. DBH activity, derived largely from sympathetic nerves, can be measured in human plasma. Patients with ADHD showed decreased activities of DBH in serum and urine. Low DBH levels correlate indirectly with the seriousness of the hyperkinetic syndrome in children [19,20]. In the DBH gene, the G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del and TaqI polymorphisms occur frequently and may affect the function of gene products or modify gene expression and thus influence the progression of ADHD. This article reviews the DBH itself and polymorphisms in the DBH gene that influence the DBH activity in the serum and the CSF level of DBH. All those are evaluated in connection with ADHD.

Abbreviations

5HTT	- serotonin transporter
A	- alanine
Arg	- arginine
ADHD	- Attention-deficit Hyperactivity Disorder
cDNA	- complementary deoxyribonucleic acid
CSF	- cerebrospinal fluid
Cys	- cysteine
DAT	- dopamine transporter
DBH	- dopamine-beta-hydroxylase
DRD4 (DRD5)	- dopamine receptor D4 (D5)
DSM-IV	- The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition
h^2	- heritability
HTR1B	- 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B
HWE	- Hardy-Weinberg equilibrium
ICD-10	- The International Classification of Diseases, 10th edition
LD	- linkage disequilibrium
QTL	- quantitative-trait locus
S	- serine
SNAP25	- synaptosomal-associated protein
SNP	- single nucleotide polymorphism
STR	- short tandem repeat

Dopamine-beta-hydroxylase – biochemistry and physiology

The Dopamine-beta-hydroxylase (DBH) is an enzyme that catalyses the conversion of dopamine to noradrenaline. In its feedback, it inhibits tyrosine-hydroxylase, which reduces the production of dopamine. DBH is found in the brain, in catecholamine vesicles of the noradrenergic neurons of the gray matter in nerve terminals [32], in sympathetic nerves and in the adrenal medulla, where it is present in both soluble and membrane-bound forms [51]. The DBH gene, which encodes DBH protein (OMIM 223360), was cloned, mapped to chromosome 9q34, and shown linked to ABO [8]. It is approximately 23 kb long, contains 12 exons coding 603 amino-acids protein [30] and exists as a single gene on genome. The genomic sequence is publicly available (Genbank accession numbers AC000404 and AC001227).

DBH is released into the circulation together with neurotransmitters and other vesicular content during synaptic transmissions [51,35] from sympathetic neurons and its enzymatic activity is analysed in plasma or serum [52] as an indicator of sympathetic noradrenergic tone. DBH found in the cerebrospinal fluid (CSF), predominantly originates in the central noradrenergic neurons [34], while DBH in the serum originates in the sympathetic nervous system [51]. Both forms correlate strongly with each other and are under a strong genetic control, with heritability of serum DBH estimated at 0.98 and that of CSF DBH at 0.83 [36]. DBH itself is the major quantitative-trait locus (QTL) for plasma DBH activity [12,55]. Associations with variation in both plasma DBH activity [50,12,11] and CSF levels of immunoreactive DBH protein [12] were shown. The difference in measured enzyme activity thus reflects differences in DBH

protein level, rather than in homospecific activity (i.e., activity per mole of enzyme).

Plasma DBH activity varies widely across unrelated individuals [53]. However, developmental studies of noradrenergic transmission during the ageing process are conflicting and the investigation of serum noradrenaline, especially in children, is very complicated for methodological reasons. The activity of noradrenergic system increases with age [58,17]. Paclt et al. [39] examined developmental changes of DBH plasma activity in relation to age in humans in a representative group of children and found that DBH activity rises continually with the exception of puberty period. It increases between 3–10 years of age and then decreases approximately at the age of 10–14 years. At the age of 21 to 60, the DBH level is stable. These findings were confirmed by experiments on animals (rats), showing the same developmental trend of enzymatic activity [39]. Weinshilboum and Axelrod [52] did not find any differences in plasma DBH activity in male and female subjects. Suzuki et al. [46] described developmental changes of DBH activity in CSF of children, adolescents and adults. The results confirmed a continual rise of DBH activity and plasma DBH activity in children, with the exception of those aged 10 to 11.

Genetics of ADHD and dopamine-beta-hydroxylase gene

Attention-deficit Hyperactivity Disorder, ADHD, is one of the most common mental disorders that develop in children. The estimations of prevalence differ with the diagnostic criterion used. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition (DSM-IV), which indicates between 3 and 6 percent of children with ADHD is the most common reference today. The International Classification of Diseases, 10th edition (ICD-10) is less strict and indicates 0.5 percent of afflicted children. A boys predominance over girls at a ratio 3:1 or more exists [1]. The principal characteristics of ADHD are inattention, hyperactivity and impulsivity. These symptoms appear early in a child's life, some of them persist to the adult age (approximately about 40–50% [38]), although they tend to diminish with age and social maturing. However, the relationships of these children both in the family and with their contemporaries are affected, increasing the risk of social isolation. 50–80 percent of ADHD children are afflicted with another co-morbid disorder [27], including oppositional defiant disorder and conduct disorder, anxiety disorder (25–30%), mood disorder (approximately 15%) and learning disabilities (between 20–30%) [4].

ADHD is a polygenetic disorder with various candidate genes. The multifactorial concept is consistent with high population prevalence of ADHD (3–6%), high concordance in monozygotic twins (68–81%), but modest recurrence risk to first-degree relatives [29]. It seems that ADHD is a complex genetic disorder, with many susceptibility genes with a small effect each [48]. Also, as the heritability (h^2) of ADHD is less than 1.0

(approximately 0.75–0.91) [32], it is likely that environmental factors also play a role in the causation and outcome of ADHD [29]. The exact mode of transmission is unknown. Various models of inheritance exist, from major gene effect to polygenic and multifactorial models [15,22], but the differences in statistical average between multifactorial genetic models and single gene inheritance are relatively small. The research of only some candidate genes (DRD4, DAT, DRD5, DBH, 5HTT, HTR1B and SNAP25) brought consistent results, confirming the heredity of ADHD syndromes [16].

It is likely that different neurotransmitter systems and the relative balance between them have varying degrees of influence over these behavioural dimensions. Variation in genes involved in these neurotransmitter systems are likely to mediate this delicate balance and have an effect on the function of these chemicals in the brain [40].

Genetics of dopamine-beta-hydroxylase activity

One of the important candidate genes is the DBH gene [16]. In experimental animals with decreased DBH in the serum, reduced conversion of dopamine to noradrenaline reduce the negative feedback on tyrosine-hydroxylase. These animals showed hyperactivity, aggression, self-stimulation and stereotypic movements [2,41]. The DBH gene therefore suggests hyperdopaminergic transmission in ADHD [29]. An association was made between different allelic variation at the DBH gene and both plasma DBH activity and CSF levels of DBH in many studies. Polymorphisms **G444A**, **G910T**, **C1603T**, **C1912T**, **C-1021T**, **5'-ins/del** and **TaqI** exist.

G444A Cubells et al. [12] studied the relationship between genotypes at this synonymous polymorphism situated in exon 2 and CSF levels of DBH protein and plasma DBH activity. They observed a significant association between the G444A genotype and both biochemical phenotypes. Furthermore, investigation of European American patients with mood or anxiety disorders suggested that the 444A allele is associated with lower plasma DBH activity and the 444G allele with higher plasma activity. Their results support the hypothesis that DBH is a major locus influencing the plasma DBH activity and the CSF DBH protein levels. Although polymorphism G444A alters the third base of a Glu codon, the primary structure of DBH protein does not alter. The alterations of CSF levels of DBH protein and plasma DBH activity in coherence with this polymorphism may be explained by G444A residing at the splice junction between exon 2 and intron 2 of DBH. Kobayashi et al. [30] demonstrated that appropriately spliced mRNAs contain either G or A allele. Nevertheless, this substitution could modify the efficiency of the mRNA splicing, thereby affecting levels of mature DBH mRNA and causing the differences in levels of DBH. Cubells et al. [11] also analysed linkage disequilibrium (LD) between G444A polymorphism and another plasma DBH-associated diallelic variant - 5'-ins/del- and confirmed their positive LD.

G910T This single nucleotide polymorphism (SNP) is non-synonymous and is located in exon 5. The difference at the nucleotide 910 causes an amino-acid altering between Ala (A) and Ser (S) at the amino-acid residue 304 [26]. Ishii et al [26] expressed the two gene variants in COS cells and suggested homospecific activities of DBH. The two forms of protein showed enzyme activities, immunoreactives, both of them had similar kinetic constants, but different homospecific activities. Ishii et al. [29] found a 13-fold difference in homospecific DBH activity between 910G and 910T alleles, with 910T encoding the lower homospecific active form. Zabetian et al. [55] examined A304S in groups of individuals representing phenotypic extremes with very low DBH activity levels. The samples were from African American, European American and Japanese population, but there were no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in these cases. Furthermore, Cubells and Zabetian [9] examined the potential functional consequences of A304S. They used the SIFT software to predict whether an amino-acid substitution affects protein function and established that A304S should be well tolerated. Interestingly, both alleles are presented in most human populations representing all major geographic regions, but only two population samples contained 910T (304S) homozygotes (Danes and Adygei). 910G (304A) is always a more common allele, with frequencies greater than 0.8 in every investigated group [10]. Further work will be necessary to evaluate the contribution of this polymorphism to heritable variation in the level and activity of DBH in serum and CSF and eventually to ADHD.

C1603T The other non-synonymous SNP is C1603T in exon 2, +1603 base pair from start site of translation. It encodes a non-conservative difference in the primary amino-acid sequence Arg535Cys and current results suggest that an allelic variance is responsible for a change in homospecificity of the enzyme [47]. Whereas plasma DBH activity is mostly influenced by the level of circulating DBH protein [11,35], in this case the 1603T allele (encoding 535Cys) appear to exhibit an additional effect due to decline in homospecific activity. The DBH holoenzyme is a homotetramer and Arg535Cys substitution may create origin disulfide bridge formation, thus altering the homospecific activity of DBH. Additionally, differences in exocytotic release of DBH protein or in its clearance from the plasma [47] may occur. The research using the SIFT software predicted that SNP C1603T would be weakly tolerated and thus might affect DBH function, because Arg is conserved in all available sequences that include the 3' end of the gene [9]. Zabetian et al. [55] supported this prediction. They found a small but significant contribution to the variance of plasma DBH activity of this SNP. Tang et al. [47] confirmed previous results. They estimated the biological effect of C1603T on plasma DBH activity in a diagnostically heterogeneous group of European population. In this sample, C-1021T genotype was found and it was confirmed that no significant LD between both polymorphisms existed.

They detected a significant additional effect of C1603T in the plasma DBH variance. C-1021T SNP accounts for 35–52 % of the variance in the trait across populations of different geographic origin [55], C1603T may explain additional 2% of variance. The low-activity 1603T allele is relative rare, with an occurrence of approximately 4% in the European population [55].

C1912T This SNP, located in exon 12, represents another member of the non-synonymous polymorphisms group. It changes the first nucleotide in codon for Arg, +1912 base pair from start site of translation, which leads to substitution of Arg->Cys. Arg->Cys should be weakly tolerated [9]. Exon 12 encoded the 3'-terminal region spanning from nucleotide +1681 to +2693 of type A cDNA and +1681 to +2393 of type B of DBH gene. Kobayashi et al. [30] examined both types of mRNA and showed evidence of inherence of two polyadenylation sites corresponding to types A and B in exon 12. The A and B types are produced by alternative polyadenylation.

C-1021T Zabetian et al. [55] sequenced a total of 6443 bp of DBH, including the proximal 1468 bp of the 5' upstream area, all exons and 2182 bp of intronic sequence in groups of individuals with very low, average and high plasma DBH activity to locate a new polymorphism associated with plasma DBH activity. Their experiments identified a C->T substitution located -1021 bp upstream of the translational start site, within the promotor, as an appropriate candidate (four from eight very low DBH activity individuals were TT homozygous). Subsequently, they examined C-1021T association to plasma activity in samples from African American, European American and Japanese population and showed the strong association of TT genotype with very low plasma DBH.

Further investigations led to the suggestion that C-1021T could be the major functional DBH polymorphism. The findings of other groups support this contemplation:

- 1) Dunnette and Weinshilbom [14] reported that DBH^L allele cause lower plasma DBH activity by diminishing the levels of circulating DBH protein, rather than by decreasing the activity of homospecific enzymes. C-1021T resides within the promotor and participates in the regulation of transcription.
- 2) Hoyle et al. [23] performed an experiment with human DBH gene in transgenic mice that suggests a region between -600 bp and -1100 bp contains elements fundamental for human DBH gene expression in noradrenergic neurons.
- 3) Kim et al. [28] observed that general transcription factors Sp1 and CREB, as well as cell-specific factors AP2, Phox2a and Phox2b bind to proximal cis-acting elements and have a critical role in synergic activation of DBH gene transcription.
- 4) C-1021T is located in a noradrenergic cell type-specific DNase I hypersensitive site of the DBH gene [25].

Two years later, Zabetian et al. [45] published their results of an experiment that investigated the LD structure of the DBH gene. They assumed C-1021T as a true functional polymorphism and examined the LD between C-1021T and another 11 markers, symmetrically distributed around C-1021T, and what is the relationship of each marker to plasma activity. They have identified a block of LD at the DBH locus, including C-1021T that spanned across nearly 10 kb of its surroundings. All of these five markers within the LD block (-2124C->T, -1021C->T, IVS1+109G->C, 444A->G and IVS4+601C->T) are strongly associated with phenotype.

5'-ins/del This polymorphism, named 5'-ins/del, consist of 19 base-pair insertion/deletion approximately 4,7 kb 5' from the transcriptional start site, -4784-4803del [11]. This region resides within the locus that Hoyle et al. [23] identified as a second positive regulatory element, between -1,5-5.8 kb (first between -600-1100 bp) that confers cell type-specific expression and contains an element responsible for the transient expression. 5'-ins/del is also associated with plasma DBH activity, particularly with deletion of lower and insertion of higher level of plasma DBH [11]. These results also showed that 5'-ins/del is in positive LD with another plasma DBH-associated polymorphism G444A and haplotype Del-A is associated with low plasma DBH activity in European American population.

TaqI The effect of this DBH SNP on the DBH levels is not completely understood. It is situated in intron 5 (IVS5+192C->T) and is easily genotyped by differential cleave with the restriction endonuclease TaqI [9].

ADHD, low DBH activity and genetic polymorphisms

In patients with the hyperkinetic syndrome and non-socialized conduct disorder, reduced DBH activity in serum and urine were recorded [5,42,43,37,38,18,20,6,7,]. Zabetian et al. [55] suggests, on the basis of their results and another hypothesis that low plasma DBH levels result from diminished expression of the DBH gene, that it is strongly associated with allele -1021T. Thus C-1021T, or another polymorphism in very tight LD with it, appears as a variant at DBH controlling plasma DBH levels and accounts for 35–52% of variation in plasma DBH activity. C1603T may explain additional 2% of variance. The low-activity 1603T allele is relatively rare, approximately 4% in European population [47]. SNP C1912T was not correlated to plasma activity and ADHD disorder. 5'-ins/del is also associated with plasma DBH activity, namely the deletion of lower and insertion of higher level of plasma DBH [11]. Wigg et al. [54] investigated the 5'-ins/del polymorphism (and another two: TaqI and (CA)_n STR) in the group of 117 families with ADHD. They observed significant relationships between the genotypes of the three polymorphisms, but no biased transmission for either of the allele of the 5'-ins/del. They also found

no significant evidence for biased transmission of the haplotypes. Hawi et al. [21] observed the G444A polymorphism in connection with ADHD and found a slight increase in the transmission of allele 444A (allele 2), but it was not statistically significant. They also analysed markers creating a high-density map across and flanking of this gene and measured inter marker LD. Strong LD was detected between markers of polymorphisms G444A (exon 2) and TaqI (intron 5). Comings et al. [6,7] investigated whether TaqI B1/B2 may be associated with ADHD in a group of probands with Tourette's syndrome. They detected that Taq B1 allele (without TaqI site) was associated with the highest ADHD scores. Other research of this problem was done by Daly et al. [13]. They used a sample of ADHD children and found an association with TaqI (A1/A2) DBH allele A2 (present TaqI site). They both probably examined the same polymorphism, but with another nomenclature and another sample of probands, which may be the explanation for their different results.

Romain et al. [44] detected an association between DBH TaqI A2 allele and ADHD in a sample of 88 Brazilian nuclear families with ADHD, thereby confirming the previous report from Daly et al. [13]. The same results were also obtained by Inkster et al. [24] from their analysis of TaqI polymorphism in two independent samples of adults with ADHD and by Kirley et al. [29]. Wigg et al. [54] sought to replicate this work, but they found no significant evidence for the linkage of the TaqI A2 allele in the sample of 117 nuclear families with ADHD. Neither did Bhaduri et al. [3], who implemented the first molecular genetic study on ADHD in an Indian subject, exploring the transmission of G444A and TaqI polymorphisms in the DBH gene. On the other hand, Smith et al. [45] tested TaqI polymorphism in 105 Caucasian subjects with ADHD and ethnicity-matched controls. They observed that the DBH TaqI A1 allele was more frequently found in the ADHD group than the control group.

Discussion

Lower plasma DBH activity is caused by disappearing levels of circulation of the DBH protein, rather than decreasing the activity of enzyme. However, which polymorphisms play the main role in this process is not known yet. It could be the ones in the code region, or those in the regulation or non-code region. Hoyle et al. [23] suggested an essential domain between -600 bp and -1100 bp. Certain elements fundamental for human DBH gene are expressed in the noradrenergic neuron. Zabetian et al. [55] suggested low plasma DBH levels result from disappearing expression of the DBH gene strongly associated with allele -1021T. 5'-ins/del, located within the second positive regulatory element, may have additional effect on the expression. Allele 5'-del is associated with lower levels of plasma DBH [11]. The alteration of CSF levels of DBH protein and plasma DBH activity in coherence with polymorphisms localized in the code region

is influenced by G444A with risk allele 444A, C1603T with relative rare risk allele 1603T (4% in European population) and G910T. Allele 910T (304S) codes the lower specific active form of protein. How does C1912T contribute to this is not exactly known. Although TaqI is localized in the non-code region, alterations in this area may have the decisive role on the final protein. Alterations may affect splicing due to origin or extinction of the artificial splice site, or some enhancer or silencer of splicing exists.

Only some of these polymorphisms were studied in connection with ADHD. Zabetian et al. [55] found that allele -1021T is associated with combined subtype of ADHD. Wigg et al. [54] observed a significant relationship of the genotypes of polymorphisms 5'-ins/del, TaqI and (CA)_n STR in the families with ADHD, in the concrete TaqA2-del-A3 and TaqA2-ins-A4. Hawi et al. [21] found a slight increase in the transmission of allele 444A in the ADHD families. Association between TaqI and ADHD was also found by Comings et al. [6,7] (allele B1), Smith et al. [45] (allele A1), Daly et al. [13], Romain et al. [44], Inkster et al. [24] and Kirley et al. [29] (all with allele A2), but some results of other studies were negative [3,54]. This difference in the DBH TaqI A polymorphism could be attributed to population stratification, resulting in a false-positive association of the A1 allele with ADHD [45].

Which polymorphisms are the most important in the ADHD and low DBH plasma activity? Which of them have the major role and which of them cause additional effects? The role of other DBH polymorphisms is unknown because these polymorphisms were not studied in connection with ADHD. In patients with hyperkinetic syndrome and in non-socialized conduct disorder patients, reduced DBH activity in serum and urine were recorded [5,42,43,37,38,18,20,6,7].

Another question is the correlation between low DBH activity and prenatal hypoxia. Koudelová et al. [31] found that hypoxia (hyperbaric chamber) decreased the DBH activity in experimental animals (rats), particularly in very young ones (5 days after delivery).

Many conflicting suggestions may emerge as a result of diagnostic problems connected to ADHD with comorbidity and changes of symptoms in patients under 5 years of age or older than 10. Further investigation of polymorphisms in the DBG gene in connection with ADHD and DBH plasma activity should be done to provide a better understanding of this disorder.

REFERENCES

- 1 Anderson JS, Williams S, McGee R, Silva PA. DSM-III-R disorders in preadolescent children: Prevalence in a large sample from the general population. *Archives of General Psychiatry*. 1987; **4**: 69-76.
- 2 Axelrod J, Weinshilbom R. Catecholamines. *N Engl J Med*. 1972; **287**(5): 237-42.
- 3 Bhaduri N, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Singh M, Mukhopadhyay KK. Analysis of polymorphisms in the dopamine Beta hydroxylase gene: association with attention deficit hyperactivity disorder in Indian children. *Indian Pediatr*. 2005; **42**(2): 123-9.
- 4 Biederman J, Newcorn J, Sprich S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am J Psychiatry*. 1991; **148**(5): 564-77.
- 5 Bowden CL, Deutsch CK, Swanson JM. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and platelet monoamine oxidase in attention deficit disorder and conduct disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1988; **27**(2): 171-4.
- 6 Comings DE, Wu S, Chiu C, Ring RH, Gade R, Ahn C. et al. Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: The additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes - DRD2, D beta H, and DAT1. *Am J Med Genet-Neuropsychiatr Genet*. 1996; **67**(3): 264-288.
- 7 Comings DE, Gade Andavolu R, Gonzales N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin Genet*. 1999; **55**(3): 160-172.
- 8 Craig SP, Buckle VJ, Lamouroux A, Mallet J, Craig IW. Localization of the human dopamine beta hydroxylase (DBH) gene to chromosome 9q34. *Cytogenet Cell Genet*. 1988; **48**(1): 48-50.
- 9 Cubells JF and Zabetian CP. Human genetics of plasma B-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology*. 2004; **174**: 463-476.
- 10 Cubells JF, Kobayashi K, Nagatsu T, Kidd KK, Kidd JR, Calafell F, et al. Population genetics of a functional variant of the dopamine beta-hydroxylase gene (DBH). *Am J Med Genet*. 1997; **74**(4): 374-9.
- 11 Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH, et al. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry*. 2000; **5**(1): 56-63.
- 12 Cubells JF, van Kammen DP, Kelley ME, Anderson GM, O'Connor DT, Price LH, et al. Dopamine beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Hum Genet*. 1998; **102**(5): 533-40.
- 13 Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry*. 1999; **4**(2): 192-6.
- 14 Dunnette J, Weinshilbom R. Human serum dopamine beta-hydroxylase: correlation of enzymatic activity with immunoreactive protein in genetically defined samples. *Am J Hum Genet*. 1976; **28**(2): 155-66.
- 15 Faraone SV, Biederman J, Chen WJ, Krifcher B, Keenan K, Moore C, et al. Segregation analysis of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatric Genetics*. 1992; **2**: 257-275.
- 16 Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005; **57**(11): 1313-23.
- 17 Freedman LS, Ohuchi T, Goldstein M, Axelrod F, Fish I, Dancis J. Changes in human serum dopamine-beta-hydroxylase activity with age. *Nature*. 1972; **236**(5345): 310-1.
- 18 Gabel S, Stadler J, Bjorn J, Shindlacker R, Bowden CL. Biodevelopmental aspects of conduct disorder in boys. *Child Psych Hum Dev*. 1993; **24**(2): 125-141.
- 19 Galvin M, TenEyck R, Shekhar A, Stilwell B, Fineberg N, Laite G, et al. Serum dopamine-beta-hydroxylase and maltreatment in psychiatrically hospitalized boys. *Child Abuse and Neglected*. 1995; **19**(7): 821-832.
- 20 Galvin M, Stilwell BM, Shekhar R, Kopta SM, Goldfarb SM. Maltreatment, conscience functioning and dopamine-beta-hydroxylase in emotionally disturbed boys. *Child Abuse and Neglected*. 1997; **21**(1): 83-92.
- 21 Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhege F, Nothen M, Greenwood T, et al. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol Psychiatry*. 2003; **8**(3): 299-308.
- 22 Hess EJ, Rogan PK, Domoto M, Tinker DE, Ladda RL, Ramer JC. Absence of linkage of apparently single gene mediated ADHD with the human syntenic region of the mouse mutant Coloboma. *Am J Med Genet*. 1995; **60**(6): 573-9.
- 23 Hoyle GW, Mercer EH, Palmiter RD, Brinster RL. Cell-specific expression from the human dopamine beta-hydroxylase promoter in transgenic mice is controlled via a combination of positive and negative regulatory elements. *J Neurosci*. 1994; **14**(5): 2455-63.
- 24 Inkster B, Muglia P, Jain U, Kennedy JL. Linkage disequilibrium analysis of the dopamine beta-hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet*. 2004; **14**(2): 117-20.
- 25 Ishiguro H, Kim KT, Joh TH, Kim KS. Neuron-specific expression of the human dopamine beta-hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. *J Biol Chem*. 1993; **268**(24): 17987-94.
- 26 Ishii A, Kobayashi K, Kiuchi K, Nagatsu T. Expression of two forms of human dopamine-beta-hydroxylase in COS cells. *Neurosci Lett*. 1991; **125**(1): 25-8.
- 27 Jensen PS, Martin BA, Cantwell DP. Comorbidity in ADHD: Implications for research, practice and DSM-IV. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 1997; **36**: 1065-1079.
- 28 Kim HS, Seo H, Yang C, Brunet JF, Kim KS. Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. *J Neurosci*. 1998; **18**(20): 8247-60.
- 29 Kirley A, Hawi Z, Daly G, McCarron M, Mullins C, Millar N, et al. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 2002; **27**(4): 607-19.
- 30 Kobayashi K, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T. Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res*. 1989; **17**(3): 1089-102.
- 31 Koudelová J, Paclt I, Mourek J, Trojan S. Variability in dopamin-beta-hydroxylase activity in plasma of rats (the effect of age and of hypoxia in plasma of children with mental disorders). In: Van Loun CR, Kvetňanský K, McCarthy R and Axelrod J, editors. *Stress: Neurochemical and Humoral Mechanisms*. New York: Gordon and Break Science Publishers, S. A; 1989. p. 967-974.
- 32 Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I. Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997; **36**(6): 737-44.
- 33 Lewis DA, Hayes TL, Lund JS, Oeth KM. Dopamine and the neural circuitry of primate prefrontal cortex: implications for schizophrenia research. *Neuropsychopharmacology*. 1992; **6**(2): 127-34.
- 34 O'Connor DT, Cervenka JH, Stone RA, Levine GL, Parmer RJ, Franco-Bourland RE, et al. Dopamine beta-hydroxylase immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to central noradrenergic neuronal activity and variation in Parkinson's disease and congenital dopamine beta-hydroxylase deficiency. *Clin Sci*. 1994; **86**(2): 149-58.
- 35 O'Connor DT, Levine GL, Frigon RP. Homologous radioimmunoassay of human plasma dopamine-beta-hydroxylase: analysis of homospesific activity, circulating plasma pool and intergroup differences based on race, blood pressure and cardiac function. *J Hypertens*. 1983; **1**(3): 227-33.

- 36 Oxenstierna G, Edman G, Iselius L, Orelund L, Ross SB, Sedvall G. Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals—a genetic study. *J Psychiatr Res*. 1986; **20**(1): 19–29.
- 37 Paclt I, Koudelová J. Dopamin-beta-hydroxylase in plasma of psychiatric patients. *Activ. nerv. super*. 1990; **32**(1): 67.
- 38 Paclt I, Koudelová J. The activity of the dopamine-beta-hydroxylase (DBH) in an experiment in animals in norm and in humans suffering with special developmental dopaminergic disturbance. Proceeding of the IBC International Conference on Dopaminergic Disorders; April 28–29, 1997; Boston, MA, USA.
- 39 Paclt I, Koudelova J. Changes of dopamine-beta-hydroxylase activity during ontogenesis in healthy subjects and in an experimental model (rats). *Physiol Res*. 2004; **53**(6): 661–7.
- 40 Quist JS, Kennedy JL. Genetics of Childhood Disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The Serotonin System. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001; **40**(2): 253–257.
- 41 Randrup A, Scheel-Kruger J. Diethylthiocarbamate and amphetamine stereotype behavior. *J Pharm Pharmacol*. 1966; **18**(11): 752.
- 42 Rogeness GA, Crawford L, McNamara A. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and preschool behaviour in children with conduct disorder. *Child Psychiatry Hum. De*. 1989; **20**(2): 149–156.
- 43 Rogeness GA, Maas JW, Javors MA, Macedo CA, Fischer C, Harris WR. Attention deficit disorder symptoms and urine catecholamines. *Psychiatry Res*. 1989; **27**(3): 241–251.
- 44 Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet*. 2002; **114**(2): 154–8.
- 45 Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, et al. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003; **119**(1): 77–85.
- 46 Suzuki H, Shimohira M, Iwakawa Y, Nagatsu T. Developmental change of dopamine beta-hydroxylase activity in cerebrospinal fluid of epileptic and non-epileptic children. *J Neural Transm Gen Sect*. 1990; **80**(3): 225–30.
- 47 Tang Y, Anderson GM, Zabetian CP, Kohnke MD, Cubells JF. Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH (+ 1603C → T) with plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005; **139**(1): 88–90.
- 48 Tannock R. Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiatry*. 1998; **39**(1): 65–99.
- 49 Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, et al. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet*. 1998; **63**(6): 1767–76.
- 50 Wei J, Ramchand CN, Hemmings GP. Possible control of dopamine beta-hydroxylase via a codominant mechanism associated with the polymorphic (GT)_n repeat at its gene locus in healthy individuals. *Hum Genet*. 1997; **99**(1): 52–5.
- 51 Weinshilbom RM. Serum dopamine beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev*. 1978; **30**(2): 133–66.
- 52 Weinshilbom R, Axelrod J. Serum dopamine- -hydroxylase: decrease after chemical sympathectomy. *Science*. 1971; **173**(4000): 931–4.
- 53 Weinshilbom RM, Raymond FA, Elveback LR, Weidman WH. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science*. 1973; **181**(103): 943–5.
- 54 Wigg K, Zai G, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, et al. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine Beta-hydroxylase. *Am J Psychiatry*. 2002; **159**(6): 1046–8.
- 55 Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, et al. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet*. 2001; **68**(2): 515–22.
- 56 Zabetian CP, Buxbaum SG, Elston RC, Kohnke MD, Anderson GM, Gelernter J, et al. The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet*. 2003; **72**(6): 1389–400.
- 57 Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. [Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children] [Article in Chinese] *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2004; **36**(3): 290–3.
- 58 Ziegler MG, Lake CR, Kopin IJ. Plasma noradrenaline increases with age. *Nature*. 1976; **261**(5558): 333–5.

Biochemical markers and genetic research of ADHD

I. Paclt¹, J. Koudelová², A. Křepelová³, P. Uhlíková¹, M. Gazdíková³ & P. Bauer³

¹ Dept. of Psychiatry, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague and General Teaching Hospital;

² Dept. of, Physiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague and General Teaching Hospital;

³ Dept. of Biology and Medical Genetic 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and General Teaching Hospital; Czech Republic.

Correspondence to: I. Paclt
Department of Psychiatry, 1st Faculty of Medicine,
Charles University Prague and General Teaching Hospital, Czech Republic,
Praha 2, Ke Karlovu 11, 128 00, Czech Republic
TEL: 224965316, FAX: 224923077,
EMAIL: pacltovi@email.cz vsemerad@volny.cz

Submitted: May 26, 2005

Accepted: June 1, 2005

Key words: ADHD; candidate genes; biochemistry; correlations; comorbidity; research

Neuroendocrinol Lett 2005; 26(4):423-430 PMID: 16135997 NEL260405R04 ©Neuroendocrinology Letters www.nel.edu

Abstract

ADHD (attention hyperactivity disorder) is a polygenetic disorder with various candidate genes. At this time, more than thirty dopaminergic, noradrenergic, serotonergic and GABA-ergic genes are known. The research of only some candidate genes (DRD4, DAT, DRD5, DBH, 5HTT, HTR1B and SNAP25) brought relatively consistent results confirming the heredity of ADHD syndromes. The results of research of other genes (DRD2, DRD3, MAO, ADR2A, GABA A3, GABA B3) are not clear yet. This paper summarizes the most important genetic data in correlations with biochemical periphery parameters (especially for DBH, HVA, MHPG, serotonin). Hypothetically, certain subgroups of ADHD may be identified by correlation of biochemical characteristics and some candidate genes. The paper discusses some implications for future research. Review.

Abbreviations:

5-HTR gene – serotonin receptor gene
5-HTTLPR – promoter region of the serotonin transporter
ADHD – attention deficit hyperactivity disorder
ADRA2A – adrenergic receptors allele 2A
CHRNA4 CHRNA7 – acetylcholine receptors 4, 7
CSF – cerebrospinal fluid
DA – dopamine
DAT – dopamine transporter
DBH – dopamine beta hydroxylase
DOPAC – dihydroxyphenylacetic acid
DRD – dopamine receptor gene
GABA – gamma amino butyric acid
HRR – haplotype relative risk
HVA – homovanillic acid
MAO – monoamine oxidase
MHPG – 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol
NE – noradrenaline
PAA – phenyl acetic acid and tyrosine
PET – positron emission tomography
SERT – serotonin receptor gene
SNAP-25 – synaptosomal-associated protein 25
TDT – transmission disequilibrium test
TS – Tourette's syndrom
VNTR – variable number of tandem repeat

Introduction

ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) is one of the most frequently diagnosed syndromes in the child psychiatry. The incidence is between 3 and 6 per cent of the children population; with boys predominating over girls at a ratio of 3:1 or more [2]. The key symptoms – *inattentiveness, impulsivity and hyperactivity* – deteriorate the relationship of these children both in the family and with their contemporaries, thus increasing the risk of social isolation. Hyperkinetic disorder (ICD-10 – International Classification Disorders, WHO, 1992) is a narrower diagnosis, and a subgroup of ADHD DSMIV diagnostic criteria, APA (American Psychiatric Association) 1994. Comorbid disorders of ADHD occur in 50% to 80% of patients [44]. These include: conduct disorders in 40% to 90%, depressive disorders in 15% to 20%, anxiety disorders in

25% and learning disorders: dyslexia, dyscalculia etc. in 20% of all ADHD patients' cases.

The hyperkinetic syndrome is up to five times more frequent in first-degree relatives of ADHD children than in control group of healthy children's families [9]. In these ADHD children's relatives, other diagnostic units were more frequent than in control group (comorbid ADHD disorders). When the occurrence of hyperkinetic disorder in biologically related and unrelated siblings of ADHD patients was compared, the following data were obtained: hyperactivity and conduct disorders were found in 47 to 53 per cent of biologically related and in 9 to 13 per cent of biologically unrelated children [82]. In adoption studies in ADHD, significant genetic role was proved [97 and other authors]. *Concordance* rates of *monozygotic vs. dizygotic* hyperkinetic twin pairs were between 50 and 80% for monozygotic twins and between 0 and 33% for dizygotic twins [90, 41, 93]. *The heritability* of ADHD varies between 0.75 and 0.98, which is *highly significant* for genetic aetiology of ADHD. [27].

At this time, more than thirty dopaminergic, noradrenergic, serotonergic and GABA genes are known. This paper summarizes the most important genetic data in correlations with biochemical periphery parameters (especially for DBH, HVA, MHPG, serotonin). The rise of ADHD phenocopy is most probable as well, caused, for instance, by perinatal hypoxia, influencing the immature dopaminergic and noradrenergic transmission, as has been proved in an animal study [52, 68].

Genetic and biochemical markers of the transmitter systems

The dopaminergic system (DRD2, DRD4, DRD3, DRD5, MAO)

Biochemical markers. The methylphenidate, a stimulant drug, inhibits the presynaptic uptake of dopamine. About seventy per cent of children and adolescents with ADHD respond positively to stimulating treatment [89]. Abnormally low level of HVA (homovanillic acid) is found in the CSF (cerebrospinal fluid) of children with ADHD, as compared with healthy controls [85]. Castellanos et al. [11] examined CSF in 29 boys of six to twelve years of age with a hyperkinetic syndrome. He found out that the level of HVA was lower in CSF of ADHD patients and the marked decrease of its level was surprisingly combined with a *lower* degree of hyperactivity. ADHD in adults is marked by this relation between the decreased plasmatic level of HVA and the presence of symptoms of the hyperkinetic syndrome missing, but the high level of HVA in CSF of ADHD adults predicts a bad response to methylphenidate [28].

MAO is a mitochondrial enzyme, participating in the degradation of neurotransmitters. The high value of plasmatic HVA and DOPAC predicts a bad response to treatment with selegiline in adult ADHD patients [28]. Boix et al. [10] proved inhibition of impulsivity in

a clone of hyperactive rats. When MAOB (monoaminoxidase B) was blocked by L-deprenyl, however, hyperactivity and attentiveness disorders were not inhibited. The levels of norepinephrine, dopamine and serotonin in neostriate, nucleus accumbens and frontal cortex decreased. Zametkin et al. [107] administered clorgyline or tranylcypromine (irreversible MAO inhibitors) to fourteen boys with a hyperkinetic syndrome and found a very good clinical response, similar to administration of stimulants. Trott et al. [95, 96] administered moclobemide to hyperkinetic children. The results were less distinct than in administration of stimulants.

DRD2 Comings et al. [14; 20] examined the prevalence of the Taq A1 allele of the *DRD2* gene. Results suggested that genetic variants at the *DRD2* locus played a role in a range of impulsive and compulsive personality disorders, addictive disorders and ADHD. Berman et al. [8] observed that the association of the *DRD2* A1 or A2 allele with a given phenotype was dependent upon the presence or absence of childhood stress symptoms. Rowe et al. [80] reported that children with the *DRD2* Taq I A2/A2 genotype had a higher mean level of ADHD symptoms than A1 carriers. Todd et al. [94] did not confirm correlation of *DRD2* receptor and ADHD. The level of HVA in CSF is connected with the density of the *DRD2* receptor and predicts the response to stimulants [17]. The HVA in CSF level rises after stimulant administration [17, 100]. Jönssen et al. [46] found a connection between the concentration of homovanillic acid and the genotype with *DRD2* A1 occurrence. *Heterozygote* A1/A2 allele had the lowest concentrations of homovanillic acid in CSF. A relation has also been described between the *DRD2* A1 genotype and the regional CNS blood flow in children with hyperkinetic syndrome. By using F-deoxyglucose in PET examination, it was found out that the A1 allele carriers have a significant reduction of glucose metabolism in the putamen, frontal, temporal, central, central prefrontal, occipitotemporal and orbital cortex [17, 92]. Genotype and allelic frequency of Taq I A polymorphism of *DRD2* gene was statistically different between ADHD group, only boys ($n = 49$), age 6–13, and control group ($n = 40$), age 6–13, only boys, $p < 0,004$ and $p < 0,001$, respectively [83]. Kirley et al. [51] examined two polymorphisms in 118 ADHD children and their families. No significant associations were identified, though they reported a trend toward significance ($p = 0.07$) for the Ser311 polymorphism when paternally transmitted. On aggregate, the studies to date suggest little or no association with ADHD [30].

DRD4 is another candidate gene. *DRD4* is a gene with a high degree of genetic variability and one of the genes influencing the post-synaptic effects of dopamine [13]. A 48 bp and 16 amino-acid repeat polymorphism is important within the DNA coding for the third cytoplasmic loop, responsible for the binding to guanine-nucleotide proteins [60]. Allele 7, conditioning the inhibition of intracellular adenylyl cyclase and thus suppressing response to dopamine, was found in 41 per cent of ADHD patients in comparison to 21 per cent of controls [54]. Two independent studies [54, 87]

describe, in normal subjects, a relation between the presence of allele 7 *DRD4*, psychomotoric instability and impulsivity. In patients with ADHD, TS (Tourette's syndrome) and drug addiction, a significantly higher occurrence of 2/2 homozygotes was described [84]. This DNA region is repeated 2 to 11 times; with the most common alleles being the 2, 4, and 7 repeat. There was a modest increase in the prevalence the allele 2 with a decrease in the prevalence of the allele 4. The mean ADHD score, based on the Diagnostic Interview Schedule for Children, was 15.6 for those carrying a 7 allele, versus 13.3 for those not carrying a 7 allele, $p < 0.015$ [29]. Independent studies of normal subjects [88] have shown an association between the presence of the allele 7 and novelty seeking, a trait associated with impulsivity. Some studies failed to find the association found by Langley et al. [55] who concluded in review and in his own study that *DRD4* 7 – repeat allele is associated with a hyperactivity and impulsivity. Many other authors supported association of *DRD4* and ADHD [26].

DAT1 gene. The importance of the *DAT1* (dopamine transporter) gene is associated to the mechanism of action of stimulants, blocking the dopamine transporter coded by this gene and thus increasing the concentration of dopamine in the synaptic cleft [101]. The changes of the transport of dopamine are probably brought about by the influence on its transmitter coded by *DAT1* gene. The dopamine transporter is responsible for the transport of dopamine through the presynaptic membrane back into the nerve cell. Stimulants inhibit the transport of dopamine and these drugs lead to an increase of dopamine in the synaptic cleft. Studies on mice proved a higher degree of hyperactivity in a strain with a *mutation* of the *DAT1* gene, leading to a change in dopamine transporter function in comparison with the normal population of animals [37]. A significantly higher number of *homozygotes alleles 10/10 DAT* – as compared to heterozygotes – was found in patients with ADHD, conduct disorders and Tourette's syndrome [16]. Cook et al. [21] examined a 3' variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at the dopamine transporter gene *DAT1* in a sample of 49 ADHD patients and their parents, using the haplotype relative risk (HRR) method. A significant association between ADHD and the 480-bp *DAT1* VNTR allele was established. Gill et al. [36] found that the 480-bp allele was preferentially transmitted to ADHD probands ($p=0,014$). Waldman et al. [102] examined the role of the *DAT1* gene in ADHD, ODD (oppositional defiant disorder) and CD (conduct disorders) in 123 families, using the TDT technique. A significant association between the *DAT1* 10 allele and hyperactivity-impulsivity ($p = 0.009$) was found. In a subsequent report, Waldman et al. [102] examined 74 ADHD probands, 79 siblings and a control sample of 49 twins and confirmed the results. These findings were not confirmed [3, 43, 76, 65]. Maher et al. [62] confirmed the association of *DAT1* and ADHD in meta-analysis of *DAT1*, which included data from 11 studies, with a total of 824 informative meioses. Chen et al. [12] identified the same association of *DAT1* and ADHD in Asian popula-

tions. When results from the family based studies noted above are pooled the OR is small, but significant, suggesting the dopamine transporter gene merits further investigation but that its effect is modest [30].

DRD3 gene. Knockout mice (ADHD model), missing the *DRD3* gene, are considerably more active than their littermates with normal *DRD3* genes [1]. The other common polymorphism is located in intron 5 and results in the change of a restriction site for *MspI* [66, 73]. Comings et al. [15] observed a significant decrease in *DRD3* *Msp I* heterozygosity in Tourette's syndrome and ADHD comorbidity. Another study, however, did not show the *DRD3* gene to be significantly associated with ADHD [6, 50, 30].

DRD5 gene. The possible role of *DRD5* gene in ADHD has been examined using a dinucleotide repeat polymorphism. The 148-bp allele *DRD5* was reported to be associated with ADHD [98]. Using the TDT technique, [24] observed a significant increase in the transmission of the 148 bp allele in 160 family sets with ADHD offspring ($p < 0.0005$). Kirley et al. [50] and Maher et al. [62] observed association between ADHD and 148 bp allele *DRD5* in others studies. Consistent with this result, a more recent family-based analysis that combined 14 independent samples identified a significant association of the 148-bp allele with ADHD (OR = 1,2; 95% CI 1,1–1,4) [61].

MAO genes. Some authors believe that a deficit of dopamine/norepinephrine in the hyperkinetic syndrome is caused by hyperactive *monoamine oxidase* (MAO) [95]. Using CA repeat polymorphisms at the MAO-A (monoamine oxidase-A) gene, Gade et al. [32] found an association of this gene with ADHD. Manor et al. [64] examined the MAO-A promoter region polymorphism in 133 triads and observed preferential transmission of the long alleles from 74 heterozygote mothers to ADHD probands ($\chi^2(2) = 4,37; p=0,036$). Lawson et al. [58] examined MAO-A polymorphisms (the 30-bp VNTR in the promoters and the *Fnu4HI* 941T-->G) in ADHD children; the results of the study were negative, but case control analysis of the VNTR showed an association with a subgroup of children with comorbid conduct problems. Jiang et al. [45] observed (in a linkage study) significant association between 157-bp allele of the *DXS 7* locus of X chromosome and DSM-III-R diagnosed ADHD ($n=72, p < 0,001$). Study in Caucasian cohort failed to replicate this association [72].

Noradrenergic system (*ADRA2A*, *DBH*)

Biochemical markers of noradrenergic system are closely connected to the dopaminergic system through the *dopamine-beta-hydroxylase enzyme*. *Dopamine-beta-hydroxylase* (*DBH*) is an enzyme responsible for the conversion of dopamine to norepinephrine. In its feedback, it inhibits tyrosine-hydroxylase, which reduces the production of dopamine. It is localized in catecholamine-containing vesicles of adrenergic and noradrenergic cells [48]. When *DBH* is defective, an alteration of the dopamine/NE levels can result in hyperactivity. *DBH* protein is released in response to

stimulation [99]. Decreased activities of DBH in serum and urine were found in patients with hyperkinetic syndrome and *unsocialised conduct disorders* [71, 53, 74, 75, 33, 34]. The authors ascertained that low DBH levels correlate indirectly with the seriousness of hyperkinetic syndrome in children.

Shekim et al. [86] found lower levels of MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol) in the urine of ADHD boys compared to healthy controls. Yasong et al. [105] observed 64 ADHD boys and 30 normal controls defining the levels of HVA, norepinephrine and the ratio of norepinephrine/MHPG in the serum. The norepinephrine blood levels were significantly lower in the group with hard degree of ADHD than in the group with a moderate degree of this disorder [105]. Norepinephrine and norepinephrine/MHPG were decreased in hyperkinetic children while HVA was increased. In patients responding positively to administration of stimulant drugs, the values of MHPG were higher than in non-responders. Gabel et al. [31] observed the MHPG levels in *children with hyperkinetic syndrome and conduct disorders* to find that the MHPG level was higher in *children with conduct disorders* in pre-puberty age. The MHPG values were lower after the 12th year of age. Kasatikova et al. [47] examined 25 children (7–9 year olds) with ADHD. ADHD children had the basal level of epinephrine and norepinephrine 3.9 to 5.4 times higher than the normal controls. Oades et al. [67] found plasma levels of norepinephrine (NE) and epinephrine slightly elevated, but urinary levels of NE and the serotonin metabolite were markedly increased. Halperin et al. [39] replicated his own previous results in a sample of ADHD children without reading disabilities, compared to ADHD children with reading disabilities. Plasma levels of MHPG were significantly lower in ADHD children *without dyslexia* compared to those with dyslexia.

ADRA2A gene. It is known that *clonidine*, influencing inattentiveness and impulsivity in ADHD treatment, acts through the pre-synaptic *adrenergic receptors (inhibiting)* and through the increase of the pre-synaptic levels of norepinephrine, and its affinity to the post-synaptic A1A receptors (exciting) is ten times lower. Clonidine leads to lowering of hyperactivity, increase of attentiveness, improvement of conduct disorders, ticks and an anxiety. ADR A2 gene codes this protein's receptor activity. Single base pair polymorphisms of the ADRA2A (adrenergic receptors A2A) gene are generally examined for the role of NE genes in ADHD [57, 78]. Higher occurrence of combinations of polymorphic alleles with 81/185 alleles A2A was described [17].

Comings et al. [18] published a study, observing the additive effect of ADR A2A, ADR A2C, and DBH genes. Combined, these three genes accounted for 3.5% of the variance in the ADHD score ($p = 0.0005$). Individually, the ADRA2C gene accounted for 2.5 percent of the variance in the ADHD score. Direct proportionality was proved between ADHD score and the quantity of polymorphisms of these noradrenergic genes, as well as higher occurrence of learning disorders comorbid to ADHD coinciding with higher frequencies of alleles of the above-mentioned polymorphisms of the adrener-

gic genes. Two subsequent family-based analyses, one in 103 families and another in 128 families, showed no evidence of association [7, 25].

DBH gene. A Taq I polymorphism B1/B2 in the DBH gene exists; the connection of the B1 allele with the hyperkinetic syndrome and the development of hyperactivity has been described [24]. Roman et al. [77] tested a sample of 88 Brazilian nuclear families and demonstrated an association between the DBH TaqI A2 allele and ADHD. Taq I A1 allele is significant associate with ADHD ($p = 0,018$) [89]. The B1 allele occurs in 52.9 per cent of patients with drug addiction, in 70.5 per cent of TS patients, and in 73.1 per cent of ADHD patients [23]. Studies using protein-phenotype markers showed strong evidence for linkage between a major locus controlling plasma-DBH activity and the ABO blood-group locus [38, 104]. Zabetian et al. [107] identified a novel polymorphism (-1021C-->T), in the 5' flanking region of the DBH gene that accounts for 35%–52% of the variation in plasma-DBH activity. Despite the mixed evidence for association between DBH and ADHD, when the family-based studies are pooled, they jointly suggest a significant association between ADHD and the 5' Taq1 polymorphism (OR = 1,33; 95% CI 1,11–1,59) [30].

Serotonin system (5-HTR, 5-HTT)

Biochemical markers. A decrease of the serotonin level in the serum was also found in ADHD patients and their parents exhibiting symptoms of hyperkinetic disorder. Patients with oppositional defiant disorder and ADHD showed lower serum 5-HT level than patients with only ADHD. The 5-HT level may be a potential biological marker of impulsive behaviour [35]. *Urinary excretion (24-hr) of beta-phenyl ethylamine* – free and total was significantly lower in ADHD children. *Phenyl acetic acid (PAA) and tyrosine* were decreased in plasma in ADHD subjects [5].

5-HTR genes = SERT (serotonin receptor genes). A gene mutation leads to a decrease of activity in the *enzyme converting tryptophan, the precursor of serotonin*. The polymorphic alleles of this gene (polymorphism G-T and G/A in introne 6 was identified) occur in ADHD, TS (Tourette's syndrom) and drug addiction in 29 to 33 per cent of cases, that is twice the frequency of control population [17]. HTR(1B) and HTR(2A) polymorphism encode the serotonin receptors of 5HTR(1B) type as well as 5HTR(2A). The authors observed a significant preferential transmission of the allele 861G of the HTR(1B) only [40]. Some findings suggest an association between HTR(1B) and ADHD, with merits future investigation. 5HTR(2A) polymorphism was associated with ADHD in papers by Quist et al. [70] and Levitan et al. [59]. Particularly interesting is an insertion/deletion polymorphism in the promoter region and VNTR within intron 2, both of which appear to have functional effect on 5HTR (SERT) expression [4]. However, in another study of 150 ADHD probands, Langley et al. [56] found no evidence for the association

with either of the 5HTR (SERT) polymorphism, alone, or combined as a haplotype.

5-HTT gene (serotonin transporter). Low serotonin activity has been associated in both animal and human studies with measures of impulsivity, aggression, and disinhibited behaviour. Recently, a common 44-bp deletion in the promoter region of the serotonin transporter (5-HTTLPR) that results in reduced transcription and lower transporter protein levels was described. As for unravelling a possible role of the 5-HTTLPR polymorphism in childhood disruptive behaviour, we examined this gene in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), a heterogeneous childhood disorder in which three phenotypes are recognized by DSM IV criteria: inattentive (type I), hyperactive-impulsive (type II), and combined type (type III). By using the haplotype relative risk design, a group of 98 triads (both parents and proband child) were tested for a possible association between 5-HTTLPR and ADHD. A significant decrease in the short/short 5-HTTLPR genotype was observed in the ADHD type III combined group (10.29% vs. 30.88%) compared to the HRR-derived control group (likelihood ratio = 9.62, $P = 0.008$, $n = 68$ triads). Similar results were observed when allele frequencies were compared (likelihood ratio = 3.81, $P = 0.05$, $n = 136$ alleles) [63]. Kent et al. [49] examined two other polymorphisms (an SNP in the 3' untranslated region and a tandem repeat) and identified significant associations for the SNP and for a haplotype including this SNP and 5-HTTLPR. When the 5-HTTLPR studies are combined, the pooled OR for the long allele is 1.31 (95% CI 1.09–1.59) [30].

GABA system (GABA B3, GABA A3)

Gamma amino butyric acid (GABA) is an inhibitory neurotransmitter and could play a role in ADHD, TS (Tourette's syndrome) and learning disorder through its ability to modulate dopamine metabolism. Studies have already been published earlier describing a significant association between homozygosity for *low molecular weight alleles* (185 bp) of *GABA B3* receptors gene (*GABAB3*) and the summary score for adult ADHD [17].

To explore the possible role of genetic variants of *GABA_A* receptor genes, the alleles of micro satellite polymorphism at the X-linked *GABAA3* gene [17] and/or *GABAB3* gene [17] were examined in Tourette's syndrome /ADHD subjects. The *GABA3* gene accounted for 0.8% of the variance of the ADHD score and the *GABAB3* accounted for 0.7%. Combined, they accounted for 1.4% of the variance [19]. These results were not replicated in other studies.

SNAP. Several investigators have used the coloboma mouse model to investigate the genetics of ADHD. These mice have the coloboma mutation, a hemizygous 2-centimorgan deletion of a segment on chromosome 2q. The mutation leads to spontaneous hyperactivity. The coloboma deletion region includes the gene encoding synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25). Hess et al. [42] tested the idea that the human homolog of the

mouse coloboma gene could be responsible for ADHD by completing linkage studies of ADHD families, using markers on human chromosome 20p11-p12, which is syntenic to the coloboma deletion region. Four family-based studies of SNAP-25 examined two biallelic SNPs (T1069C and T1065G) separated by 4 bp at the 3' end of the gene. Despite some conflicting results the pooled analyses for T1065G shows significant evidence for an association with ADHD (OR = 1.19; 95% CI 1.03–1.38) [30].

Discussion

The research of only some candidate genes (DRD3, DRD4, DAT, DRD5, DBH, 5HTT, HTR1B a SNAP25) brought consistent results confirming the heredity of ADHD syndromes.

Some candidate genes acetylcholine receptors: (CHRNA4 CHRNA7), glutamate receptors, tryptophan hydroxylase gene, thyroline hydroxylase gene, catechol o methyl transferase gene, and norepinephrine transporter gene, did not show association with ADHD [30].

The results of research of other genes (DRD2, MAO, ADR2A, GABA A3, GABA B3) are still not clear. Understanding these genes can help comprehending polygenetic aetiology of some subgroups of ADHD and aetiology of ADHD with some comorbid disorders.

Hypothetically, certain sub-groups of ADHD may be identified by correlation of some phenotype-characteristics (behavioural, and pharmacogenetic biochemical), with some candidate genes. Changes of biochemical markers were described in some groups of ADHD and in some groups of ADHD comorbid disorders.

Research correlations of periphery and central (cerebrospinal fluid) value of biochemistry markers are limited by ethical regulations. There are only some positive results in HVA, DBH and serotonin. But we presume about some identical or equivalent noradrenergic, dopaminergic or serotonergic activity, in CF and periphery, what is representing by some biochemical marker's value.

In some ADHD children, the plasma level of MHPG was decreased and plasma level of HVA was increased [105]. Circulating dopamine increased significantly by the exercise in the control subjects ($p < 0.016$), but no increase was noted in the subjects with ADHD [103]. Children with extremely low MHPG were non-responders to stimulant drugs therapy. The question is whether some connection between very low MHPG and DAT 10/10 genotype (also non responders to stimulant drugs) exists [79, 51]. Plasma levels of noradrenaline and MHPG may be elevated in ADHD patients with comorbid disorders: dyslexia, conduct disorder [39].

A decrease of the serotonin level in the serum was also found in ADHD patients and their parents who had had hyperkinetic syndromes in their childhood. Oppositional defiant disorder, comorbid to ADHD, showed lower serum 5HT level than pure ADHD. 5HT level may be a potential biological marker of impulsive behaviour. [35]

Lower levels of DBH protein may lead to elevated ratios of DA to NE. This model may explain associations between lower plasma DBH activity and vulnerability to psychotic symptoms. Genotype-controlled analysis of plasma DBH holds promise for promoting further progress in research on psychiatric and neurological disorders [22]. Decreased activity of DBH in serum was found in ADHD and in un-socialized conduct disorder. Socialized conduct disorder co morbid to ADHD was not connected with low DBH activity [71, 53, 75, 33, 34, 81]. The (CA)_n repeat polymorphism allele A4 and 19 bp insertion/deletion (5' nondescribed area) elevate plasma DBH activity.

Biochemical markers are not used in identification of some ADHD subgroups often. Some biochemical markers (5HT, DBH, MHPG) differ, in some cases, pure ADHD and ADHD with comorbid disorders. However, results introduced here are evidently suitable for possible use in a future genetic research.

There are some difficulties in diagnosis and clinical syndromes connected with changes in ADHD symptoms during development from childhood to adolescents and adults. Some biochemical periphery parameters may change during child development as well [69].

Other possibilities in the study of ADHD aetiology lie in pharmacogenetic markers research and correlation of pharmacogenetic and biochemistry markers. The problem of how each transmitter system participates in aetiology of ADHD can be studied on the drugs used in therapy of ADHD with *specific* mechanism of action. There are dopaminergic drugs (stimulants), nor-epinephrine drug (atomoxetine) and serotonin drugs (serotonin re-uptake inhibitors, especially citalopram, which is the most specific serotonin re-uptake inhibitor). On the other hand, differentiation of some groups by certain candidate genes may help predict responders or non-responders to individual drugs.

REFERENCES

- Accili D. A new look at dopamine D3 receptors. *Mol Psychiatry* 1996; **1**(2):93-4.
- Anderson JS, Williams S, McGee R, Silva PA. DSM-III-R disorders in preadolescent children: Prevalence in a large sample from the general population. *Arch Gen Psychiatry* 1987; **44**(1):69-76.
- Asherson P, Virdee V, Curran S, Ebersole L, Freeman B, Craig I, Simonson E, Eley T, Plomin R, Taylor E. Association study of DSM IV attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and monoamine pathway genes. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 1998; **81**(6):549.
- Asherson P. and IMAGE consortium. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2004; **13**(Supl 1):150-70.
- Baker GB, Bornstein RA, Rouget AC, Ashton SE, van Muzden JC, Coutts RT. Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder. *Biol Psychiatry* 1991; **29**(1):15-22.
- Barr CL, Wigg KG, Wu J, Zai C, Bloom S, Tannock R, Roberts W, Malone M, Schachar R, Kennedy JL. Linkage study of two polymorphisms at the dopamine D3 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 2000a; **96**(1):114-7.
- Barr CL, Wigg KG, Feng Y, Zai G, Roberts W, Malone M, Schachar R, et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and the adrenergic receptors alpha1C and alpha2C. *Mol Psychiatry* 2001; **6**(3):334-7.
- Berman SM, Noble EP. The D2 dopamine receptor (DRD2) gene and family stress; interactive effects on cognitive functions in children. *Behav Genet* 1997; **27**(1):33-43.
- Biederman J, Munir K, Kline D, Habelow W, Armentano M, Autor S, Hoge SK, Wateraux C. A family study of patients with attention deficit disorder and normal controls. *J Psychiatr Res* 1986; **20**(4):263-74.
- Boix F, Qiao SV, Kolpus T, Sagvolden T. Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention Deficit /Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Res* 1998; **94**(1):153-62.
- Castellanos FX, Elia J, Kruesi MJ, Gulotta CS, Mefford IN, Potter WZ, Ritchie GF, Rapoport JL. Cerebrospinal monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 1994; **52**(3):305-16.
- Chen CK, Chen SL, Mill J, Huang YS, Lin SK, Curran S, Purcell S, Sham P, Asherson P. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry*. 2003; **8**(4):393-6.
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol H H M. Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur J Pharmacol - Molecular Pharmacology Section*. 1991; **207**(4):277-86.
- Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrani B, Tast D, Knell E, Kocsis P, Baumgarten R, Kovacs BW, Levy DL, Smith M, Kane JM, Lieberman JA, Klein DN, MacMurray J, Tosk J, Sverd J, Gysin R, Flanagan S. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *J Am Med Assn* 1991; **266**(13):1793-800.
- Comings DE, Muhleman D, Dietz G, Dino M, Legro R, Gade R. Association between Tourette's syndrome and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *Lancet* 1993; **341**(8849):906.
- Comings DE, Wu S, Chiu C, Ring RH, Gade R, Ahn C, MacMurray JP, Dietz G, Muhleman D. Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: The additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes - DRD2, D beta H, and DAT1. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 1996; **67**(3):264-88.
- Comings DE. Genetics of ADHD, conference IBC, April 28-29, Boston 1997. IBC's International Conference on Dopaminergic Disorders Novel Approaches for Drug Discovery and Development. April 28-29, 1997, The Ritz-Carlton, Boston, book non-paginated.
- Comings DE, Gade Andavolu R, Gonzales N, Blake H, Wu S, Macmurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette's syndrome subjects. *Clin Genet* 1999; **55**(3):160-72.
- Comings DE. Clinical and molecular genetics of ADHD and Tourette syndrome. Two related polygenic disorders. *Ann NY Acad Sci* 2001; **6**(931):50-83.
- Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D, Blake H, Dietz G, Saucier G, MacMurray JP. Comparison of the role of dopamine, serotonin, and noradrenaline genes in ADHD, ODD and conduct disorder: multivariate regression analysis of 20 genes. *Clin Genet* 2000; **57**(3):178-96.
- Cook EH, Jr Stein MA, Ellison T, Unis AS, Leventhal BL. Attention deficit hyperactivity disorder and whole-blood serotonin levels: effects of comorbidity. *Psychiatry Res* 1995; **57**(1):13-20.
- Cubells JF, Zabetian CP. Human genetics of plasma dopamine-beta-hydroxylase activity: Applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology*. 2004; **174**(4):463-76.
- D'Amato T, Leboyer M, Malafosse A, Samolyk L, Lamouroux A, Junien C, Mallet J. Two Taq I dimorphic sites at the human beta-hydroxylase locus. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**(14):5871.
- Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, and Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 1999; **4**(2):192-6.
- De Luca V, Muglia P, Vincent JB, Lanktree M, Jain U, Kennedy JL. Adrenergic alpha 2C receptor genomic organization: association study in adult ADHD. *Am J Med Genet* 2004; **127B**(1):65-7.
- DiMaio S, Grizenko N, Joober R. Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder: a review. *J Psychiatry Neurosci* 2003; **28**(1):27-38.
- Edelbrock C, Rende R, Plomin R, Thompson LA. A twin study of competence and problem behaviour in childhood and early adolescence. *J Child Psychol Psychiatry*, 1995, **36**(5):775-85.
- Ernst M. Presynaptic Dopaminergic activity in adults and Children with ADHD by PET and (fluorine-18) fluorodopa. Attention

- 66 Muglia P, Jain U, Kennedy JL. A transmission disequilibrium test of the Ser9/Gly dopamine D3 receptor gene polymorphism in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 2002b; **130**(1-2):91-5.
- 67 Oades RD, Daniels R, Rascher W. Plasma neuropeptide-Y, monoamine metabolism, electrolyte excretion and drinking behavior in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 1998; **80**(2):177-86.
- 68 Paclt I, Koudelová J. Activity of the dopamin-beta hydroxylase (DBH) in experiments in animals, in norms and in humans suffering with special developmental dopaminergic disorders. Boston, 1997, April 30, IBC ADHD conference, book. Non-paginate.
- 69 Paclt I, Koudelová J. Changes of dopamine-beta-hydroxylase activity during ontogenesis in healthy subjects and in an experimental model (rats). *Physiol Res* 2004; **53**(6):661-7.
- 70 Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J, Kennedy JL. Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* 2000; **5**(5):537-41.
- 71 Rappoport J, Quinn P & Lambrecht F. Minor physical anomalies and plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in hyperactive boys. *Am J Psychiatry* 1974; **131**(4):386-90.
- 72 Payton A, Holmes J, Barrett JH, Sham P, Harrington R, McGuffin P, et al. Susceptibility genes for a trait measure of attention deficit hyperactivity disorder: A pilot study in a non-clinical sample of twins. *Psychiatry Res* 2001; **105**(3):273-8.
- 73 Retz W, Rosler M, Supprian T, Retz-Junginger P, Thome J. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and violent behavior: relation to impulsiveness and ADHD-related psychopathology. *J Neural Transm* 2003; **110**(5):561-72.
- 74 Rogness GA, Crawford L, McNamara A. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and preschool behaviour in children with conduct disorder. *Child Psychiatry Hum De* 1989a; **20**(2):149-56.
- 75 Rogness GA, Maas JW, Javors MA, Macedo CA, Fischer C, Harris WR. Attention deficit disorder symptoms and urine catecholamines. *Psychiatry Res* 1989b; **27**(3):241-51.
- 76 Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 2001; **105**(5):471-8.
- 77 Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 2002a; **114**(2):154-8.
- 78 Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet* 2003; **120B**(1):116-20.
- 79 Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH. Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 2002b; **12**(6):497-9.
- 80 Rowe DC, Den Oord EJ, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Gilson M, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. The DRD2 TaqI polymorphism and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1999; **4**(6):580-6.
- 81 Rowe DC, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry* 2001; **6**(4):429-33.
- 82 Safer DJA. Familial factor in minimal brain dysfunction. *Behav Genet* 1973; **3**(2):175-86.
- 83 Serý O, Theiner P, Hladilová R, Štaif R, Balaščíková B, Drtílková I. Geny pro II-6 a DRD2 souvisejí s hyperkinetickou poruchou. *Ces slovensk psychiat* 2003; **99**(8):404-9.
- 84 Saucier G, Muhleman D, Gade R, Wu S, Chiu C, Blake H, Macmurray J, Comings D. Polygenes associated with intravenous drug use. *Psychiatr Genet* 1996; **6**(3):161.
- 85 Shaywitz BA, Cohen DJ, Bowers MB. CSF monoamine metabolites in children with minimal brain dysfunction: Evidence for alteration of brain dopamine. *J Pediatr* 1977; **90**(1):67-71.
- 86 Shekim WO, Dekirmenjian H, Chapel JL. Urinary MHPG Excretion in Minimal Brain Dysfunction and Its Modification by d-Amphetamine. *Am J Psychiatry* 1979; **136**(5):667-71.
- 87 Smalley LS. Genetic Influences in Childhood-Onset Psychiatric Disorders Autism and Attention - Deficit / Hyperactivity Disorder. *Am J Hum Genet* 1997; **60**(6):1276-82.
- 88 Smidt LA, Fox NA, Perez-Edgar K, Hu S, Hamer DH. Association of DRD4 with attention problems in normal childhood development. *Psychiatr Genet* 2001; **11**(1):25-9.
- 89 Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Nava BA. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: Genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Medical Genetics* 2005; **119B**(1):77-85.
- 90 Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; **35**(4):409-32.
- 91 Stevenson J. Evidence for a genetic aetiology in hyperactivity in children. *Behav Genet* 1992; **22**(3):337-44.
- 92 Tannock R. Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Advances in Cognitive, Neurobiological, and Genetics Research. *J Child Psychol Psychiatry* 1998; **39**(1):65-99.
- 93 Thapar A, Hervas A, McGuffin P. Childhood hyperactivity scores are highly heritable and show sibling competition effects: twin study evidence. *Behav Genet* 1995; **25**(6):537-44.
- 94 Todd RD, Lobos EA. Mutation screening of the dopamine D2 receptor gene in attention-deficit hyperactivity disorder subtypes: preliminary report of a research strategy. *Am J Med Genet* 2002; **114**(1):34-41.
- 95 Trott GE, Friese HJ, Menzel M, Nissen G. Use of moclobemide in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacology* 1992; **106**(Suppl):134-6.
- 96 Trott GE, Menzel M, Friese HJ, Nissen G. Wirksamkeit und Verträglichkeit des selektiven MAOA Inhibitors Moclobemid bei Kindern mit hyperkinetischen Syndrom. *Z Kinder Jugendpsychiatr* 1991; **19**(4):248-53.
- 97 Van Der Oord EJ, Boomsma DI, Verhulst FC. A study of problem behaviors in 10- to 15 year old biologically related and unrelated adopts. *Behav Genet* 1994; **24**(3):193-205.
- 98 Vanyukov MM, Moss HB, Gioio AE, Hughes HB, Kaplan BB, Tarter RE. An association between a microsatellite polymorphism at the DRD5 gene and the liability to substance abuse: pilot study. *Behav Genet* 1998; **28**(2):75-82.
- 99 Viveros H, Somjen GG. Magnesium-calcium antagonism in the contraction of arterioles. *Experientia*, 1968, **24**(5):457-9.
- 100 Volkow ND, Ding U, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey SL, Ashby C, Lieberman J, Hitzemann R, Wolf AP. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in human brain. *Arch Gen Psychiatry* 1995; **52**(6):456-63.
- 101 Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Fifford A, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N. Prediction of Reinforcing Responses to Psychostimulants in Humans by Brain Dopamine D2 Receptor Levels. *Am J Psychiatry* 1999; **156**(9):1440-3.
- 102 Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Koziel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH, Sanders ML, Gard JM, Stever C. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet* 1998; **63**(6):1767-76.
- 103 Wigal SB, Nemet D, Swanson JM, Regino R, Trampush J, Ziegler MG, Cooper DM. Catecholamine response to exercise in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr-Res* 2003; **53**(5):756-61.
- 104 Wilson AF, Elston RC, Siervogel RM, Tran LD. Linkage of a gene regulating dopamine-beta-hydroxylase activity and the ABO blood group locus. *Am J Hum Genet* 1988; **42**(1):160-6.
- 105 Yasong D, Linyan S, Xuerong L. Measurement of serum catecholamines in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Chin J Psychiatry* 1998; **31**(1):30-3.
- 106 Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim KS, Kim CH, Malison RT, Gelernter J, Cubells JF. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 2001; **68**(2):S11-22.
- 107 Zimetkin A, Rappoport JL, Murphy DL, et al. Treatment of hyperactive children monoamine oxidase inhibitors. *Arch Gen Psychiatry* 1985; **42**(10):962-6.

Polymorphisms of Dopamine- β -Hydroxylase in ADHD Children

(dopamine- β -hydroxylase / plasma activity / ADHD / polymorphism / G444A / G910T / 1603T / C-1021T / 5'-ins/del / TaqI)

M. KOPEČKOVÁ¹, I. PACLT², P. GOETZ¹

¹Institute of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Psychiatry, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Abstract. ADHD is a multifactorial disorder clinically characterized by inattentiveness, impulsivity and hyperactivity. The occurrence of this disorder varies between 3 and 6% of the child population, with boys predominating over girls at a ratio of 3 : 1 or more. Dysfunction or imbalance between the dopaminergic and noradrenergic systems of neurotransmitters can play a key role in the ADHD pathophysiology. Alteration of the dopamine/noradrenaline levels can result in hyperactivity. DBH is an enzyme responsible for the conversion of dopamine into noradrenaline. The DBH protein is released in response to stimulation. DBH activity, derived largely from sympathetic nerves, can be measured in human plasma. Patients with ADHD showed decreased activities of DBH in serum and urine. Low DBH levels correlate indirectly with the seriousness of the hyperkinetic syndrome in children (Galvin et al., 1995, 1997). In the *DBH* gene, the G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del and TaqI polymorphisms occur frequently and may affect the function of gene products or modify gene expression and thus influence the progression of ADHD. This article reviews the DBH itself and polymorphisms in the *DBH* gene that influence the DBH activity in the serum and the CSF level of DBH. All those are evaluated in connection with ADHD.

Genetics of ADHD

Attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD, is one of the most common mental disorders that develop in children. The estimations of prevalence differ with the diagnostic criterion used. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition (DSM-IV), which indicates between 3 and 6% of children with ADHD, is the most common reference today. The International Classification of Diseases, 10th edition (ICD-10) is less strict and indicates 0.5% of afflicted children. A boys' predominance over girls at a ratio 3 : 1 or more exists (Anderson et al., 1987). The principal characteristics of ADHD are inattention, hyperactivity, and impulsivity. These symptoms appear early in a child's life, some of them persist to the adult age – approximately about 40–50%, although they tend to diminish with age and social maturing. However, the relationships of these children both in the family and with their contemporaries are affected, increasing the risk of social isolation. Fifty to eighty % of ADHD children are afflicted with another co-morbid disorder (Jensen et al., 1997), including oppositional defiant disorder and conduct disorder, anxiety disorder (25–30%), mood disorder (approximately 15%) and learning disabilities (between 20–30%) (Biederman et al., 1991).

ADHD is a polygenetic disorder with various candidate genes. The multifactorial concept is consistent with high population prevalence of ADHD (3–6%), high concordance in monozygotic twins (68–81%), but modest recurrence risk to first-degree relatives (Kirley et al., 2002). It seems that ADHD is a complex genetic disorder, involving many susceptibility genes with a small effect each (Tannock et al., 1998). Also, as the heritability (h^2) of ADHD is less than 1.0 (approximately 0.75–0.91) (Levy et al., 1997), it is likely that environmental factors also play a role in the causation and outcome of ADHD (Kirley et al., 2002). The exact mode of transmission is unknown. Various models of inheritance exist, from major gene effect to polygenic and multifactorial models (Faraone et al., 1992; Hess et al., 1995), but the differences in statistical average between multifactorial genetic models and single gene

Corresponding author: Marta Kopečková, Institute of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol, V Úvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic. Phone: (+420) 224 433 521; fax: (+420) 224 433 520; e-mail: marta.kopeckova@seznam.cz

Abbreviations: 5HTT – serotonin transporter, A – alanine, ADR – adrenergic receptor, Arg – arginine, ADHD – attention-deficit hyperactivity disorder, cDNA – complementary deoxyribonucleic acid, CSF – cerebrospinal fluid, Cys – cysteine, DAT – dopamine transporter, DBH – dopamine- β -hydroxylase, DRD4 (DRD5) – dopamine receptor D4 (D5), DSM-IV – The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition, h^2 – heritability, HTR1B – 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B, HVA – homovaline acid, HWE – Hardy-Weinberg equilibrium, ICD-10 – The International Classification of Diseases, 10th edition, LD – linkage disequilibrium, MHPG – 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, NT – noradrenaline transporter, PNMT – phenylethanolamine-N-methyltransferase, QTL – quantitative-trait locus, S – serine, SNAP25 – synaptosomal-associated protein, SNP – single nucleotide polymorphism, STR – short tandem repeat.

inheritance are relatively small. The research of only some candidate genes (*DRD4*, *DAT*, *DRD5*, *DBH*, *5HTT*, *HTR1B* and *SNAP25*) brought consistent results, confirming the heredity of ADHD syndromes (Faraone, 2005).

It is likely that different neurotransmitter systems and the relative balance between them have varying degrees of influence over these behavioural dimensions. Variation in genes involved in these neurotransmitter systems are likely to mediate this delicate balance and have an effect on the function of these chemicals in the brain (Quist and Kennedy, 2001).

Noradrenergic system

This system is closely connected to the dopaminergic system through the *dopamine- β -hydroxylase* enzyme converting dopamine into noradrenaline. Shekim et al. (1979) found lower levels of MHPG (metabolite of noradrenaline) in the urine of ADHD boys compared to healthy controls. Yasong et al. (1998) observed 64 ADHD boys and 30 normal controls defining the levels of noradrenaline and the ratio of noradrenaline/MHPG in the serum. Both parameters were decreased in hyperkinetic children while HVA (metabolite of dopamine) was increased. In patients responding positively to administration of stimulants, the values of MHPG were higher than in non-responders. The noradrenaline levels were significantly lower than in the group with a moderate degree of this disorder (Yasong et al., 1998). Dysfunction or imbalance between the dopaminergic and noradrenergic systems of neurotransmitters can play a key role in the ADHD pathophysiology. Gabel et al. (1993) observed the MHPG levels in children with hyperkinetic syndrome and conduct disorders and found out that the MHPG level was higher in children with conduct disorders in prepubertal age. The MHPG values were lower after the 12th year of age. The HVA level was remarkably lower in prepubertal children with conduct disorders than in children over 12.

Other genetic markers implying metabolic changes and altered levels of neurotransmitters in the noradrenaline system are genes *PNMT* (*phenylethanolamine-N-methyltransferase*), an enzyme converting noradrenaline into epinephrine, and *NT* (*noradrenaline transporter*). The activity of adrenergic receptors, especially of β 2A, in the frontal cortex is directly connected with the development of inattentiveness and impulsivity. It is known that clonidine influencing inattentiveness and impulsivity in ADHD treatment acts through the pre-synaptic A2A receptors (inhibiting) and through the increase of the pre-synaptic levels of noradrenaline, and has ten times lower affinity to the post-synaptic A1A receptors (exciting). In clinical terms, clonidine leads to lowering of hyperactivity, increase of attentiveness, improvement of conduct disorders, ticks and anxiety. Comings et al. (1999) published a study observing the additive effect of *ADR A2A*, *ADR*

A2C and *DBH* genes. These three genes combined accounted for 3.5% of the variance of ADHD score ($P = 0.0005$). Individually, the *ADR A2C* gene accounted for 2.5 % of the variance of ADHD score.

Direct proportionality was proved between the ADHD score and the quantity of polymorphisms of noradrenergic genes as well as higher occurrence of learning disorders co-morbid to ADHD. The data mentioned in this study suggest a connection between noradrenergic system genes and ADHD.

Dopamine- β -hydroxylase – biochemistry and physiology

One of the important candidate genes is the *DBH* gene (Faraone, 2005). The dopamine- β -hydroxylase (DBH) is an enzyme that catalyses the conversion of dopamine to noradrenaline. In its feedback, it inhibits tyrosine-hydroxylase, which reduces the production of dopamine. DBH is found in the brain, in catecholamine vesicles of the noradrenergic neurons of the gray matter in nerve terminals (Lewis et al., 1992), in sympathetic nerves and in the adrenal medulla, where it is present in both soluble and membrane-bound forms (Weinshilboum, 1978). The *DBH* gene, which encodes the DBH protein (OMIM 223360), was cloned, mapped to chromosome 9q34, and shown linked to *ABO* (Craig et al., 1988). It is approximately 23 kb long, contains 12 exons coding for 603 amino-acid protein (Kobayashi et al., 1989) and exists as a single gene in the genome. The genomic sequence is publicly available (Genbank accession numbers AC000404 and AC001227).

DBH is released into the circulation together with neurotransmitters and other vesicular content during synaptic transmissions (Weinshilboum, 1978; O'Connor et al., 1983) from sympathetic neurons and its enzymatic activity is analysed in plasma or serum (Weinshilboum and Axelrod, 1971) as an indicator of sympathetic noradrenergic tone. DBH found in the cerebrospinal fluid (CSF) predominantly originates in the central noradrenergic neurons (O'Connor et al., 1994), while DBH in the serum originates in the sympathetic nervous system (Weinshilboum 1978). Both forms correlate strongly with each other and are under a strong genetic control, with heritability of serum DBH estimated at 0.98 and that of CSF DBH at 0.83 (Oxentsterna et al., 1986). DBH itself is the major quantitative-trait locus (QTL) for plasma DBH activity (Cubells et al., 1998; Zabetian et al., 2001). Associations with variation in both plasma DBH activity (Wei et al., 1997; Cubells et al., 1998, 2000) and CSF levels of immunoreactive DBH protein (Cubells et al., 1998) have been shown. The difference in measured enzyme activity thus reflects differences in the DBH protein level, rather than in homospesific activity (i.e., activity per mole of enzyme).

Plasma DBH activity varies widely across unrelated individuals (Weinshilboum et al., 1973). However, developmental studies of noradrenergic transmission during the ageing process are conflicting and the investigation of serum noradrenaline, especially in children, is very complicated for methodological reasons. The activity of noradrenergic system increases with age (Freedman et al., 1972; Ziegler et al., 1976). Paclt et al. (2004) examined developmental changes of DBH plasma activity in relation to age in humans in a representative group of children and found that DBH activity rises continually with the exception of puberty period. It increases between 3–10 years of age and then decreases approximately at the age of 10–14 years. At the age of 21 to 60, the DBH level is stable. These findings were confirmed by experiments on animals (rats), showing the same developmental trend of enzymatic activity (Paclt et al., 2004). Weinshilboum and Axelrod (1971) did not find any differences in plasma DBH activity in male and female subjects. Suzuki et al. (1990) described developmental changes of DBH activity in CSF of children, adolescents and adults. The results confirmed a continual rise of DBH activity in CSF in children, with the exception of those aged 10 to 11.

In experimental animals with decreased DBH in the serum, reduced conversion of dopamine to noradrenaline reduced the negative feedback on tyrosine-hydroxylase. These animals showed hyperactivity, aggression, self-stimulation and stereotypic movements (Randrup and Scheel-Kruger, 1966). The *DBH* gene therefore suggests hyperdopaminergic transmission in ADHD (Kirley et al., 2002). An association was made between different allelic variation at the *DBH* gene and both plasma DBH activity and CSF levels of DBH in many studies. Polymorphisms G444A, G910T, C1603T, C1912T, C-1021T, 5'-ins/del and TaqI exist.

Polymorphisms of DBH

C-1021T Zabetian et al. (2001) sequenced a total of 6443 bp of *DBH*, including the proximal 1468 bp of the 5'upstream area, all exons, and 2182 bp of the intronic sequence in groups of individuals with very low, average and high plasma DBH activity to locate a new polymorphism associated with plasma DBH activity. Their experiments identified a C->T substitution located – 1021 bp upstream of the translational start site, within the promoter, as an appropriate candidate (four from eight very low DBH activity individuals were TT homozygous). Subsequently, they examined C-1021T association to plasma activity in samples from African American, European American and Japanese population and showed a strong association of the TT genotype with very low plasma DBH.

Further investigations led to the suggestion that C-1021T could be the major functional DBH polymor-

phism. The findings of other groups support this contemplation:

- 1) Durette and Weinshilboum (1976) reported that the DBH^L allele causes lower plasma DBH activity by diminishing the levels of circulating DBH protein, rather than by decreasing the activity of homo-specific enzymes. C-1021T resides within the promoter and participates in the regulation of transcription.
- 2) Hoyle et al. (1994) performed an experiment with the human *DBH* gene in transgenic mice suggesting that a region between -600 bp and -1100 bp contains elements fundamental for human *DBH* gene expression in noradrenergic neurons.
- 3) Kim et al. (1998) observed that general transcription factors Sp1 and CREB, as well as cell-specific factors AP2, Phox2a and Phox2b bind to proximal *cis*-acting elements and have a critical role in synergic activation of *DBH* gene transcription.
- 4) C-1021T is located in a noradrenergic cell type-specific DNase I hypersensitive site of the *DBH* gene (Ishiguro et al., 1993).

Two years later, Zabetian et al. (2001) published their results of an experiment that investigated the LD structure of the *DBH* gene. They assumed C-1021T as a true functional polymorphism and examined the LD between C-1021T and another 11 markers, symmetrically distributed around C-1021T, and what is the relationship of each marker to plasma activity. They identified a block of LD at the *DBH* locus, including C-1021T that spanned across nearly 10 kb of its surroundings. All of these five markers within the LD block (-2124C->T, -1021C->T, IVS1+109G->C, 444A->G and IVS4+601C->T) are strongly associated with the phenotype.

5'-ins/del This polymorphism, named 5'-ins/del, consists of 19 base-pair insertion/deletion approximately 4.7 kb 5' from the transcriptional start site, -4784-4803del (Cubells et al., 2000). This region resides within the locus that Hoyle et al. (1994) identified as a second positive regulatory element, between -1.5–5.8 kb (first between -600–1100 bp) that confers cell type-specific expression and contains an element responsible for the transient expression. 5'-ins/del is also associated with plasma DBH activity, particularly with deletion of lower and insertion of higher level of plasma DBH (Cubells et al., 2000). These results also showed that 5'-ins/del is in positive LD with another plasma DBH-associated polymorphism G444A and haplotype Del-A is associated with low plasma DBH activity in European American population.

G444A Cubells et al. (1998) studied the relationship between genotypes at this synonymous polymorphism situated in exon 2 and CSF levels of the DBH protein and plasma DBH activity. They observed a significant association between the G444A genotype and both bio-

chemical
European
orders su
lower pla
higher pl
thesis tha
DBH ac
Although
a Glu cod
not alter
and plas
morphis
splice ju
Kobayasi
spliced n
less, this
mRNA sp
mRNA a
Cubells e
um (LD)
plasma I
and conf

G910T
is non-sy
ference
alteration
acid resi
expresse
gested he
of protei
active, b
different
found a
ty betwe
the lowe
(2001) e
senting p
ity level
European
were no
um (HW
Zabetian
sequence
predict v
tein func
tolerated
most hu
graphic r
tained 9
910G (3
quencies
(Cubells
evaluate
table var
and CSF
C1603T
in exon 2

chemical phenotypes. Furthermore, investigation of European American patients with mood or anxiety disorders suggested that the 444A allele is associated with lower plasma DBH activity and the 444G allele with higher plasma activity. Their results support the hypothesis that DBH is a major locus influencing the plasma DBH activity and the CSF DBH protein levels. Although polymorphism G444A alters the third base of a Glu codon, the primary structure of DBH protein does not alter. The alterations of CSF levels of DBH protein and plasma DBH activity in coherence with this polymorphism may be explained by G444A residing at the splice junction between exon 2 and intron 2 of DBH. Kobayashi et al. (1989) demonstrated that appropriately spliced mRNAs contain either G or A allele. Nevertheless, this substitution could modify the efficiency of the mRNA splicing, thereby affecting levels of mature DBH mRNA and causing the differences in levels of DBH. Cubells et al. (2000) also analysed linkage disequilibrium (LD) between G444A polymorphism and another plasma DBH-associated diallelic variant – 5'-ins/del- and confirmed their positive LD.

G910T This single nucleotide polymorphism (SNP) is non-synonymous and is located in exon 5. The difference at the nucleotide 910 causes an amino-acid alteration between Ala (A) and Ser (S) at the amino-acid residue 304 (Ishii et al, 1991). Ishii et al (1991) expressed the two gene variants in COS cells and suggested homospecific activities of DBH. The two forms of protein showed enzyme activities, were immunoreactive, both of them had similar kinetic constants but different homospecific activities. Ishii et al. (1991) found a 13-fold difference in homospecific DBH activity between 910G and 910T alleles, with 910T encoding the lower homospecific active form. Zabetian et al. (2001) examined A304S in groups of individuals representing phenotypic extremes with very low DBH activity levels. The samples were from African American, European American and Japanese population, but there were no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in these cases. Furthermore, Cubells and Zabetian (2004) examined the potential functional consequences of A304S. They used the SIFT software to predict whether an amino-acid substitution affects protein function and established that A304S should be well tolerated. Interestingly, both alleles are presented in most human populations representing all major geographic regions, but only two population samples contained 910T (304S) homozygotes (Danes and Adygei). 910G (304A) is always a more common allele, with frequencies greater than 0.8 in every investigated group (Cubells et al., 1997). Further work will be necessary to evaluate the contribution of this polymorphism to heritable variation in the level and activity of DBH in serum and CSF and eventually to ADHD.

C1603T The other non-synonymous SNP is C1603T in exon 2, +1603 base pair from the start site of transla-

tion. It encodes a non-conservative difference in the primary amino-acid sequence Arg535Cys and current results suggest that an allelic variance is responsible for a change in homospecificity of the enzyme (Tang et al., 2005). Whereas plasma DBH activity is mostly influenced by the level of circulating DBH protein (O'Connor et al., 1983), in this case the 1603T allele (encoding 535Cys) appears to exhibit an additional effect due to a decline in homospecific activity. The DBH holoenzyme is a homotetramer and Arg535Cys substitution may cause disulphide bridge formation, thus altering the homospecific activity of DBH. Additionally, differences in exocytotic release of the DBH protein or in its clearance from the plasma (Tang et al., 2005) may occur. The research using the SIFT software predicted that SNP C1603T would be weakly tolerated and thus might affect DBH function, because Arg is conserved in all available sequences that include the 3' end of the gene (Cubells and Zabetian, 2004). Zabetian et al. (2001) supported this prediction. They found a small but significant contribution to the variance of plasma DBH activity of this SNP. Tang et al. (2005) confirmed previous results. They estimated the biological effect of C1603T on plasma DBH activity in a diagnostically heterogeneous group of European population. In this sample, the C-1021T genotype was found, and it was confirmed that no significant LD between both polymorphisms existed. These authors detected a significant additional effect of C1603T in the plasma DBH variance. C-1021T SNP accounts for 35–52% of the variance in the trait across populations of different geographic origin (Zabetian et al., 2001), C1603T may explain additional 2% of variance. The low-activity 1603T allele is relatively rare, with an occurrence of approximately 4% in the European population (Tang et al., 2005).

C1912T This SNP, located in exon 12, represents another member of the non-synonymous polymorphism group. It changes the first nucleotide in the codon for Arg, +1912 base pair from the start site of translation, which leads to substitution Arg->Cys. Arg->Cys should be weakly tolerated (Cubells and Zabetian, 2004). Exon 12 encodes the 3'-terminal region spanning from nucleotide +1681 to +2693 of type A cDNA and +1681 to +2393 of type B of the *DBH* gene. Kobayashi et al. (1989) examined both types of mRNA and showed evidence of inheritance of two polyadenylation sites corresponding to types A and B in exon 12. The A and B types are produced by alternative polyadenylation.

TaqI The effect of this DBH SNP on the DBH levels is not completely understood. It is situated in intron 5 (IVS5+192C->T) and is easily genotyped by differential cleavage with the restriction endonuclease *TaqI* (Cubells and Zabetian, 2004).

ADHD, low DBH activity and genetic polymorphisms

In patients with the hyperkinetic syndrome and non-socialized conduct disorder, reduced DBH activity in serum and urine were recorded (Bowden et al., 1988; Rogeness et al., 1989a, b; Paclt and Koudelová, 1990; Gabel et al., 1993; Galvin et al., 1995, 1997; Comings et al., 1996, 1999). Zabetian et al. (2001) suggest, on the basis of their results and another hypothesis that low plasma DBH levels result from diminished expression of the *DBH* gene, that it is strongly associated with allele -1021T. Thus C-1021T, or another polymorphism in very tight LD with it, appears as a variant at DBH controlling plasma DBH levels and accounts for 35–52% of variation in plasma DBH activity. C1603T may explain the additional 2% of variance. The low-activity 1603T allele is relatively rare, approximately 4% in European population (Tannock, 1998). SNP C1912T was not correlated to plasma activity and ADHD disorder. 5'-ins/del is also associated with plasma DBH activity, namely the deletion of lower and insertion of higher level of plasma DBH (Cubells et al., 2000). Wigg et al. (2002) investigated the 5'-ins/del polymorphism (and another two: TaqI and (CA)_n STR) in a group of 117 families with ADHD. They observed significant relationships between the genotypes of the three polymorphisms, but no biased transmission for either of the allele of the 5'-ins/del. They also found no significant evidence for biased transmission of the haplotypes. Hawi et al. (2003) observed the G444A polymorphism in connection with ADHD and found a slight increase in the transmission of allele 444A (allele 2), but it was not statistically significant. They also analysed markers creating a high-density map across and flanking this gene and measured inter-marker LD. Strong LD was detected between markers of polymorphisms G444A (exon 2) and TaqI (intron 5). Comings et al. (1996, 1999) investigated whether TaqI B1/B2 may be associated with ADHD in a group of probands with Tourette's syndrome. They detected that the TaqI B1 allele (without TaqI site) was associated with the highest ADHD scores. Research of this problem was also done by Daly et al. (1999). They used a sample of ADHD children and found an association with TaqI (A1/A2) DBH allele A2 (present TaqI site). They both probably examined the same polymorphism, but with another nomenclature and another sample of probands, which may be the explanation for their different results.

Romain et al. (2002) detected an association between the DBH TaqI A2 allele and ADHD in a sample of 88 Brazilian nuclear families with ADHD, thereby confirming the previous report from Daly et al. (1999). The same results were also obtained by Inkster et al. (2004) from their analysis of TaqI polymorphism in two independent samples of adults with ADHD and by Kirley et al. (2002). Wigg et al. (2002) sought to replicate this

work, but they found no significant evidence for the linkage of the TaqI A2 allele in the sample of 117 nuclear families with ADHD. Neither did Bhaduri et al. (2005), who implemented the first molecular genetic study on ADHD in an Indian subject, exploring the transmission of G444A and TaqI polymorphisms in the *DBH* gene. On the other hand, Smith et al. (2003) tested TaqI polymorphism in 105 Caucasian subjects with ADHD and ethnicity-matched controls. They observed that the DBH TaqI A1 allele was more frequently found in the ADHD group than in the control group.

Summary

Lower plasma DBH activity is caused by disappearing levels of circulation of the DBH protein, rather than decreasing the activity of the enzyme. However, which polymorphisms play the main role in this process is not known yet. It could be the ones in the coding region or those in the regulation or non-coding region. Hoyle et al. (1994) suggested an essential domain between -600 bp and -1100 bp. Certain elements fundamental for the human *DBH* gene are expressed in the noradrenergic neuron. Zabetian et al. (2001) suggested that low plasma DBH levels result from disappearing expression of the *DBH* gene strongly associated with allele -1021T. 5'-ins/del, located within the second positive regulatory element, may have additional effect on the expression. Allele 5'-del is associated with lower levels of plasma DBH (Cubells et al., 2000). The alteration of CSF levels of DBH protein and plasma DBH activity in coherence with polymorphisms localized in the coding region is influenced by G444A with risk allele 444A, C1603T with relatively rare risk allele 1603T (4% in European population) and G910T. Allele 910T (304S) codes for the lower specific active form of protein. How C1912T contributes to this is not known exactly. Although TaqI is localized in the non-coding region, alterations in this area may play a decisive role for the final protein. Alterations may affect splicing due to the origin or extinction of the artificial splice site, or some enhancer or silencer of splicing exists.

Only some of these polymorphisms were studied in connection with ADHD. Zabetian et al. (2001) found that allele -1021T is associated with a combined subtype of ADHD. Wigg et al. (2002) observed a significant relationship of the genotypes of polymorphisms 5'-ins/del, TaqI and (CA)_n STR in the families with ADHD, in particular TaqA2-del-A3 and TaqA2-ins-A4. Hawi et al. (2003) found a slight increase in the transmission of allele 444A in the ADHD families. Association between TaqI and ADHD was also found by Comings et al. (1996, 1999) (allele B1), Smith et al. (2003) (allele A1), Daly et al. (1999), Romain et al. (2002), Inkster et al. (2004) and Kirley et al. (2002) (all with allele A2), but some results of other studies were negative (Wigg et al., 2002; Bhaduri et al., 2005). This

differenc
attribute
a false-p
(Smith e

Which
ADHD a
have the
effects?

unknown
in connec
ic syndr
patients,

recorded
b; Paclt
Galvin e

Another
DBH ac
(1989)
decrease

(rats), p
delivery

Many
of diagn
morbidity

years of
polymor
ADHD

provide

Refere

Andersor

DSM-
lence i
Gen. P

Bhaduri,
P. K.,
polym
ciation
an chil

Biederm
attenti
depres
148, 5

Bowden,
ma do
dase in
Am. A

Comings
C., M
Polyg
attenti
defian

three c
J. Med
Comings

Wu, S
noradr
attenti
abilitie
160-17

difference in the DBH TaqI A polymorphism could be attributed to population stratification, resulting in a false-positive association of the A1 allele with ADHD (Smith et al., 2003).

Which polymorphisms are the most important in the ADHD and low DBH plasma activity? Which of them have the major role and which of them cause additional effects? The role of other DBH polymorphisms is unknown because these polymorphisms were not studied in connection with ADHD. In patients with hyperkinetic syndrome and in non-socialized conduct disorder patients, reduced DBH activity in serum and urine were recorded (Bowden et al., 1988; Rogness et al., 1989a, b; Paclt and Koudelová, 1990; Gabel et al., 1993; Galvin et al., 1995, 1997; Comings et al., 1996, 1999).

Another question is the correlation between low DBH activity and prenatal hypoxia. Koudelová et al. (1989) found that hypoxia (hyperbaric chamber) decreased the DBH activity in experimental animals (rats), particularly in very young ones (5 days after delivery).

Many conflicting suggestions may emerge as a result of diagnostic problems connected to ADHD with comorbidity and changes of symptoms in patients under 5 years of age or older than 10. Further investigation of polymorphisms in the *DBH* gene in connection with ADHD and DBH plasma activity should be done to provide a better understanding of this disorder.

References

- Anderson, J. S., Williams, S., McGee, R., Silva, P. A. (1987) DSM-III-R disorders in preadolescent children: Prevalence in a large sample from the general population. *Arch. Gen. Psychiatry* **4**, 69-76.
- Bhaduri, N., Sinha, S., Chattopadhyay, A., Gangopadhyay, P. K., Singh, M., Mukhopadhyay, K. K. (2005) Analysis of polymorphisms in the dopamine β hydroxylase gene: association with attention deficit hyperactivity disorder in Indian children. *Indian Pediatr.* **42**, 123-129.
- Biederman, J., Newcorn, J., Sprich, S. (1991) Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am. J. Psychiatry* **148**, 564-577.
- Bowden, C. L., Deutsch, C. K., Swanson, J. M. (1988) Plasma dopamine- β -hydroxylase and platelet monoamine oxidase in attention deficit disorder and conduct disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **27**, 171-174.
- Comings, D. E., Wu, S., Chiu, C., Ring, R. H., Gade, R., Ahn, C., MacMurray, J. P., Dietz, G., Muhleman, D. (1996) Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: The additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes - DRD2, D β H, and DAT1. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatr. Genet.* **67**, 264-288.
- Comings, D. E., Gade Andavolu, R., Gonzales, N., Blake, H., Wu, S., MacMurray, J. P. (1999) Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin. Genet.* **55**, 160-172.
- Craig, S. P., Buckle, V. J., Lamouroux, A., Mallet, J., Craig, I. W. (1988) Localization of the human dopamine β hydroxylase (DBH) gene to chromosome 9q34. *Cytogenet. Cell Genet.* **48**, 48-50.
- Cubells, J. F., Zabetian, C. P. (2004) Human genetics of plasma B-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology* **174**, 463-476.
- Cubells, J. F., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Kidd, K. K., Kidd, J. R., Calafell, F., Kranzler, H. R., Ichinose, H., Gelernter J. (1997) Population genetics of a functional variant of the dopamine β -hydroxylase gene (DBH). *Am. J. Med. Genet.* **74**, 374-379.
- Cubells, J. F., van Kammen, D. P., Kelley, M. E., Anderson, G. M., O'Connor, D. T., Price, L. H., Malison, R., Rao, P. A., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Gelernter, J. (1998) Dopamine β -hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Hum. Genet.* **102**, 533-540.
- Cubells, J. F., Kranzler, H. R., McCance-Katz, E., Anderson, G. M., Malison, R. T., Price, L. H., Gelernter, J. (2000) A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine β -hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol. Psychiatry* **5**, 56-63.
- Daly, G., Hawi, Z., Fitzgerald, M., Gill, M. (1999) Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol. Psychiatry* **4**, 192-196.
- Dunnette, J., Weinshilboum, R. (1976) Human serum dopamine β -hydroxylase: correlation of enzymatic activity with immunoreactive protein in genetically defined samples. *Am. J. Hum. Genet.* **28**, 155-166.
- Faraone, S. V., Biederman, J., Chen, W. J., Krifcher, B., Keenan, K., Moore, C., Sprich, S., Tsuang, M. T. (1992) Segregation analysis of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Genet.* **2**, 257-275.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., Sklar P. (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* **57**, 1313-1323.
- Freedman, L. S., Ohuchi, T., Goldstein, M., Axelrod, F., Fish, I., Dancis, J. (1972) Changes in human serum dopamine- β -hydroxylase activity with age. *Nature* **236**, 310-311.
- Gabel, S., Stadler, J., Bjorn, J., Shindledecker, R., Bowden, C. L. (1993) Biodevelopmental aspects of conduct disorder in boys. *Child. Psych. Hum. Dev.* **24**, 125-141.
- Galvin, M., TenEyck, R., Shekhar, A., Stilwell, B., Fineberg, N., Laite, G., Karwisch, G. (1995) Serum dopamine- β -hydroxylase and maltreatment in psychiatrically hospitalized boys. *Child Abuse Negl.* **19**, 821-832.
- Galvin, M., Stilwell, B. M., Shekhar, R., Kopta, S. M., Goldfarb, S. M. (1997) Maltreatment, conscience functioning and dopamine- β -hydroxylase in emotionally disturbed boys. *Child Abuse Negl.* **21**, 83-92.
- Hawi, Z., Lowe, N., Kirley, A., Gruenhage, F., Nothen, M., Greenwood, T., Kelsoe, J., Fitzgerald, M., Gill, M. (2003) Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol. Psychiatry* **8**, 299-308.
- Hess, E. J., Rogan, P. K., Domoto, M., Tinker, D. E., Ladda, R. L., Ramer, J. C. (1995) Absence of linkage of apparently single gene mediated ADHD with the human syntenic

- region of the mouse mutant Coloboma. *Am. J. Med. Genet.* **60**, 573-579.
- Hoyle, G. W., Mercer, E. H., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1994) Cell-specific expression from the human dopamine β -hydroxylase promoter in transgenic mice is controlled via a combination of positive and negative regulatory elements. *J. Neurosci.* **14**, 2455-2463.
- Inkster, B., Muglia, P., Jain, U., Kennedy, J. L. (2004) Linkage disequilibrium analysis of the dopamine β -hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Genet.* **14**, 117-120.
- Ishiguro, H., Kim, K. T., Joh, T. H., Kim, K. S. (1993) Neuron-specific expression of the human dopamine β -hydroxylase gene requires both the cAMP-response element and a silencer region. *J. Biol. Chem.* **268**, 17987-17994.
- Ishii, A., Kobayashi, K., Kiuchi, K., Nagatsu, T. (1991) Expression of two forms of human dopamine- β -hydroxylase in COS cells. *Neurosci. Lett.* **125**, 25-28.
- Jensen, P. S., Martin, B. A., Cantwell, D. P. (1997) Comorbidity in ADHD: Implications for research, practice and DSM-IV. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **36**, 1065-1079.
- Kim, H. S., Seo, H., Yang, C., Brunet, J. F., Kim, K. S. (1998) Noradrenergic-specific transcription of the dopamine β -hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites. *J. Neurosci.* **18**, 8247-8260.
- Kirley, A., Hawi, Z., Daly, G., McCarron, M., Mullins, C., Millar, N., Waldman, I., Fitzgerald, M., Gill, M. (2002) Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology* **27**, 607-619.
- Kobayashi, K., Kurosawa, Y., Fujita, K., Nagatsu, T. (1989) Human dopamine β -hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* **17**, 1089-1102.
- Koudelová, J., Paclt, I., Mourek, J., Trojan, S. (1989) Variability in dopamin- β hydroxylase activity in plasma of rats (the effect of age and of hypoxia in plasma of children with mental disorders). In: Van Loun, C. R., Kvetňanský, K., McCarthy, R. and Axelrod, J., Eds. *Stress: Neurochemical and Humoral Mechanismus*. New York: Gordon and Breach Science Publishers, S. A. pp. 967-974.
- Levy, F., Hay, D. A., McStephen, M., Wood, C., Waldman, I. (1997) Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **36**, 737-744.
- Lewis, D. A., Hayes, T. L., Lund, J. S., Oeth, K. M. (1992) Dopamine and the neural circuitry of primate prefrontal cortex: implications for schizophrenia research. *Neuropsychopharmacology* **6**, 127-134.
- O'Connor, D. T., Levine, G. L., Frigon, R. P. (1983) Homologous radio-immunoassay of human plasma dopamine- β -hydroxylase: analysis of homospecific activity, circulating plasma pool and intergroup differences based on race, blood pressure and cardiac function. *J. Hypertens.* **1**, 227-233.
- O'Connor, D. T., Cervenka, J. H., Stone, R. A., Levine, G. L., Parmer, R. J., Franco-Bourland, R. E., Madrazo, I., Langlais, J., Robertson, D., Biaggioni, I. (1994) Dopamine β -hydroxylase immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to central noradrenergic neuronal activity and variation in Parkinson's disease and congenital dopamine β -hydroxylase deficiency. *Clin. Sci.* **86**, 149-158.
- Oxenstierna, G., Edman, G., Iselius, L., Orelund, L., Ross, S. B., Sedvall, G. (1986) Concentrations of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of twins and unrelated individuals—a genetic study. *J. Psychiatr. Res.* **20**, 19-29.
- Paclt, I., Koudelová, J. (1990) Dopamine- β -hydroxylase in plasma of psychiatric patients. *Activ. Nerv. Super.* **32**, 67.
- Paclt, I., Koudelová, J. (2004) Changes of dopamine- β -hydroxylase activity during ontogenesis in healthy subjects and in an experimental model (rats). *Physiol. Res.* **53**, 661-667.
- Quist, J. S., Kennedy, J. L. (2001) Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* **40**, 253-257.
- Randrup, A., Scheel-Kruger, J. (1966) Diethylthiocarbamate and amphetamine stereotype behavior. *J. Pharm. Pharmacol.* **18**, 752.
- Rogeness, G. A., Crawford, L., McNamara, A. (1989a) Plasma dopamine- β -hydroxylase and preschool behaviour in children with conduct disorder. *Child Psychiatry Hum. Dev.* **20**, 149-156.
- Rogeness, G. A., Maas, J. W., Javors, M. A., Macedo, C. A., Fischer, C., Harris, W. R. (1989b) Attention deficit disorder symptoms and urine catecholamines. *Psychiatry Res.* **27**, 241-251.
- Romain, T., Schmitz, M., Polanczyk, G. V., Eizirik, M., Rohde, L. A., Hutz, M. H. (2002) Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine- β -hydroxylase gene. *Am. J. Med. Genet.* **114**, 154-158.
- Shekim, W. O., Javaid, J., Davis, J.M., Bylund, D. B. (1983) Urinary MHPG and HVA excretion in boys with attention deficit hyperactivity disorder and hyperactivity treated with d-amphetamine. *Biol. Psychiatry* **18**, 707-714.
- Smith, K. M., Daly, M., Fischer, M., Yiannoutsos, C. T., Bauer, L., Barkley, R., Navia, A. (2003) Association of the dopamine β hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **119**, 77-85.
- Suzuki, H., Shimohira, M., Iwakawa, Y., Nagatsu, T. (1990) Developmental change of dopamine β -hydroxylase activity in cerebrospinal fluid of epileptic and non-epileptic children. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* **80**, 225-230.
- Tang, Y., Anderson, G. M., Zabetian, C. P., Kohnke, M. D., Cubells, J. F. (2005) Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH (+ 1603C \rightarrow T) with plasma dopamine β -hydroxylase activity. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **139**, 88-90.
- Tannock, R. (1998) Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J. Child Psychol. Psychiatry* **39**, 65-99.
- Waldman, I. D., Rowe, D. C., Abramowitz, A., Kozel, S. T., Mohr, J. H., Sherman, S. L., Cleveland, H. H., Sanders, M. L., Gard, J. M., Stever, C. (1998) Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1767-1776.
- Wei, J., Ramchand, C. N., Hemmings, G. P. (1997) Possible control of dopamine β -hydroxylase via a codominant mechanism associated with the polymorphic (GT) n repeat at its gene locus in healthy individuals. *Hum. Genet.* **99**, 52-55.

- L., Ross, Dopamine and unrelated, 19-29. Dopamine β -hydroxylase in, 32, 67. Dopamine- β -hydroxylase subunit, *Res.* 53.
- hood dis-
m. *J. Am.*
- carbamate
Pharma-
- 9a) Plas-
ma behaviour in
Hum.
- do, C. A.,
Attention deficit disorder
Psychiatry Res.
- zirik, M.,
Evidence for the
dopamine hypothesis of
attention deficit disorder
J. Med.
- B. (1983)
Attention deficit disorder
in boys treated with
methylphenidate
14.
- os, C. T.,
Association of the
dopamine β -hydroxylase
gene with attention deficit
hyperactivity disorder
in Chinese longi-
tudinal study
Psychiatr.
- T. (1990)
Attention deficit disorder
in Chinese children
14.
- ce, M. D.,
Association of the
dopamine β -hydroxylase
gene with attention deficit
hyperactivity disorder
in Chinese children
Genet. B.
- disorder:
1) genetic
- zel, S. T.,
H., San-
gstad, and
attention-
deficit hyperactivity
disorder
J. Hum.
- 1) Possible
dominant
2) repeat
expansion
Genet. 99.
- Weinshilboum, R. M. (1978) Serum dopamine β -hydroxylase. *Pharmacol. Rev.* 30, 133-166.
- Weinshilboum, R., Axelrod, J. (1971) Serum dopamine- β -hydroxylase: decrease after chemical sympathectomy. *Science* 173, 931-934.
- Weinshilboum, R. M., Raymond, F. A., Elveback, L. R., Weidman, W. H. (1973) Serum dopamine- β -hydroxylase activity: sibling-sibling correlation. *Science* 181, 943-945.
- Wigg, K., Zai, G., Schachar, R., Tannock, R., Roberts, W., Malone, M., Kennedy, J. L., Barr, C. L. (2002) Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine β -hydroxylase. *Am. J. Psychiatry* 159, 1046-1048.
- Yasong, D., Linyan, S., Xuerong, L. (1998) Measurement of serum catecholamines in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Chinese J. Psychiatry* 31, 30-33.
- Zabetian, C. P., Anderson, G. M., Buxbaum, S. G., Elston, R. C., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kim, K. S., Kim, C. H., Malison, R. T., Gelernter, J., Cubells, J. F. (2001) A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine β -hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 515-522.
- Zabetian, C. P., Buxbaum, S. G., Elston, R. C., Kohnke, M. D., Anderson, G. M., Gelernter, J., Cubells, J. F. (2003) The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine β -hydroxylase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1389-1400.
- Zhang, H. B., Wang, Y. F., Li, J., Wang, B., Yang, L. (2004) Association of dopamine β -hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children. [in Chinese] *Beijing Da Xue Xue Bao* 36, 290-293.
- Ziegler, M. G., Lake, C. R., Kopin, I. J. (1976) Plasma norepinephrine increases with age. *Nature* 261, 333-335.

Depletion of T_{reg} Cells Augments the Therapeutic Effect of Cancer Vaccines

J. BUBENÍK

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Immune responses are controlled by both positive (upregulatory) and negative (downregulatory) signals. T cells generating the upregulatory signals, T helper (T_H) cells, were intensively studied in a variety of experimental systems and their crucial role for immune surveillance can be demonstrated during human immunodeficiency virus (HIV) infection. HIV utilizes for its entry into human organisms surface receptors on T_H cells. The cytopathogenic and other effects of HIV lead to the T_H cell depletion, breakdown of immune responses, including breakdown of the resistance to various pathogens and some ncoplasms. Therefore, the infection of the AIDS patients with pathogens that are harmless for HIV-uninfected individuals may be lethal for the patients.

The T cells generating downregulatory signals were, in analogy with CD4⁺ T_H cells, designated as CD4⁺ T suppressor (T_S) cells. For a long time their particular phenotype and function were not known in detail. The pioneer work of Gershon and Kondo (1970, 1971) helped in this sense. Fujimoto et al. (1975) suggested that T_S cells can negatively regulate tumour immunity and contribute to tumour growth in tumour-bearing mice. In 1980 Berendt and North provided first definitive evidence that the T_S cells that can be found in tumour-bearing individuals can inhibit tumour rejection (see also Bursucker and North, 1984, North and Bursucker, 1984). In 1995, Sakaguchi et al. demonstrated that the CD4⁺ T_S cells, which constitutively express interleukin-2 receptor α chain (CD25), can maintain immunologic self-tolerance and that the CD25 molecules can serve as a phenotypic marker for CD4⁺ suppressors designated here as CD4⁺ regulatory T cells

(T_{regs}). These authors have shown that breakdown of the single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. Transfer of CD4⁺ T cells depleted of CD25⁺ cells into nu/nu recipients induced organ-specific autoimmune diseases, and co-transfer of CD25⁺CD4⁺ cells with the CD25⁻CD4⁺ cells prevented development of the diseases. Additional studies (Fontenot et al., 2003; Hori et al. 2003) have demonstrated that the transcription factor forkhead box P3 (Foxp3) is a key internal cellular marker of T_{regs} and a primary developmental and functional factor for CD4⁺CD25⁺ T_{regs}. At least two subpopulations of T_{regs} exist: naturally occurring T_{regs} (natural T_{regs}) and adaptively induced T_{regs} (adaptive T_{regs}, Bluestone and Abbas, 2003). Natural T_{regs} play a crucial role in the normal immune system by suppressing autoreactive T cells and maintaining immune tolerance. These cells are generated in thymus and constitute 5–10 % of peripheral CD4⁺ T cells in mice. Adaptive T_{regs} specific for foreign (infectious, tumour) antigens are probably of extrathymic origin and are generated in periphery from the peripheral T-cell repertoire.

How can we, by depletion of T_{reg} cells, avoid autoimmunity and enhance the tumour immunity? The solution to this problem has not yet been definitively reached. It is supposed that normal animals harbour tumour-reactive T cells that are potentially capable of eradicating autologous tumours, but their activation and expansion is being suppressed by the presence of natural T_{regs} that maintain self-tolerance. In some models it has been shown that the intensity and spectrum of autoimmune responses elicited by removal of T_{regs} depend on the degree and duration of depletion, the age of the animals, their genetic background and route of the depleting antibody administration. Thus, tumour immunity could perhaps be evoked without serious autoimmunity by limiting the duration, the degree, and the mode of T_{reg} depletion, and by taking into consideration the age and genetic makeup of the tumour host (for review and discussion, see Mahic et al., 2006; Yamaguchi and Sakaguchi, 2006).

In vivo depletion of CD25⁺ T cells was capable of inhibiting, reducing, or preventing growth of a variety of murine neoplasms, such as melanoma B16, spontaneous leukaemias ASL1 and AKSL2, EL-4 leukaemia, radiation-induced leukaemias RL1 and RL8, plasmacytoma X5563, mastocytoma P815, mineral oil-induced myeloma MOPC70-A, methylcholanthrene-induced

Received November 1, 2006. Accepted November 16, 2006.

The work of the author reviewed in this Editorial was supported by grants No. 018933 from EU-FP6-NoE Clinigene, No. AV0Z50520514 from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, and by the League Against Cancer, Prague.

Corresponding author: Jan Bubenik, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 37 Prague 6, Czech Republic; e-mail: bubenik@img.cas.cz

Abbreviations: CEA – human carcinoembryonic antigen, DC – dendritic cells, HIV – human immunodeficiency virus, HPV16 – human papillomavirus type 16, IL – interleukin, T_H – T helper cells, T_{regs} – regulatory T cells, T_S – T suppressor cells.