



H U 0 0 0 2 2 7 2 4 6 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **227 246**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 00904**(51) Int. Cl.: **C12Q 1/68**

(2006.01)

(22) A bejelentés napja: **2004. 04. 30.**(40) A közzététel napja: **2006. 02. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2010. 12. 28.**

(72) Feltalálók:

dr. Puskás László 25%, Szeged (HU);
dr. Zvara Ágnes 25%, Szeged (HU);
dr. Sántha Miklós 20%, Szeged (HU);
dr. Szekeres György 15%, Szeged (HU);
dr. Janka Zoltán 15%, Szeged (HU)

(73) Jogosult:

Szegedi Biológiai Központ, Magyar
Tudományos Akadémia, Szeged (HU)

(74) Képviselő:

dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Gének alkalmazása molekuláris markerként a szkizofrénia
diagnosztizálásában, és diagnosztikai készlet

(57) Kivonat

A szkizofrénia az egyik legelterjedtebb pszichiátriai betegség, mely a humán populáció 1%-át érinti. Napjainkban a szkizofrénia diagnosztizálása összetett klinikai tünetek alapján történik és a betegség kritériuma a tünetek tartós, legalább 6 hónapon keresztül tartó fennállását is magában foglalja. Könnyen analizálható perifériás molekuláris genetikai markerek a pszichiátriai betegségek diagnosztizálását pontosabbá és gyorsabbá tehetnék. Irodalmi adatok szerint a D1 csoportba (D₅) és a D2 csoportba (D₂, D₃, D₄) tartozó dopaminreceptorok génjei a perifériális vér limfocitáiban (PBL) is expresszálódnak. Kvantitatív reverz transzkripció PCR (RT-PCR) eljárással kimutatták, hogy szkizofrén betegek limfocitáiban a dopamin D₃ receptor (DRD3) gén túlexpresszálódik, és így e gén feltételezhetően mind diagnosztikai, mind a gyógyszeres kezelés nyomon követésére alkalmas markernek tekint-

hető. A szerzők 6 gyógyszermentes, illetve gyógyszeres kezelésben még nem részesült férfi és 7 nő betegből, valamint 5–5, nem szerint osztályozott kontroll-egyénből származó limfocitát elemeztek. Mikromátrixanalízissel kimutatták, hogy egy, a D2 dopaminreceptor-csoportba tartozó másik receptor gén, a dopamin D₂ receptor (DRD2), illetve a befelé irányító káliumcsatorna (Kir2.3) gén a szkizofrén betegek limfocitáiban túlexpresszálódik. A megnövekedett mRNS-szinteket mind a SybrGreen, mind a kettős jelölésű TaqMan-próbán alapuló QRT-PCR módszerrel is igazolták. Mindkét molekuláris marker alkalmazása lehetővé teszi a szkizofrénia gyorsabb és precíz diagnózisát, illetve elősegítheti a terápia során a gyógyszerek hatékonyságának nyomon követését szkizofrén páciensek hatékonyabb, egyénre szabott gyógyszeres kezelésének biztosítására.

HU 227 246 B1

A találmány a szkizofrénia diagnosztizálásának területére tartozik.

Közelebbről, a találmány tárgya eljárás szkizofrénia kimutatására egy adott alanyban, amely eljárásban az alábbi gének közül legalább egynek meghatározzuk a génexpressziós szintjét periferiális vér limfocitáiban: DRD2-t vagy Kir2.3-t kódoló gén. A találmány tárgyát képezik továbbá az említett fehérjéket vagy az azokat kódoló nukleinsavakat specifikusan megkötni képes vegyületek és azok alkalmazása, diagnosztikai készletek és szkrinelési eljárások.

A szkizofrénia olyan súlyos, neuropszichiátriai elváltozás, amelyet a mentális, érzelmi és mozgatófolyamatok zavara jellemez⁵. E komplex és pusztító betegség az emberi populációnak körülbelül 1%-át érinti.

Sok bizonyíték van arra, hogy a szkizofréniának genetikai háttere van, és bizonyos gének expressziós mintázata megváltozott a szkizofréniás páciensekben. Intenzív kísérletek folytak azzal az elsődleges céllal, hogy megtalálják azokat a megfelelő genetikai markereket, amelyek lehetővé teszik a szkizofrénia még a szimptómák kifejlődése előtti vagy a korábbiaknál megbízhatóbb diagnosztizálását. Általában számos gént vagy fehérjét tartanak a szkizofrénia markerének, azonban e gének vagy fehérjék jellemzése még mindig csak felületes, vagy nincs meggyőző bizonyíték arra, hogy ezek expressziós szintje szignifikánsan különbözik az egészséges és a beteg egyénekben.

A WO 0144269 számú nemzetközi közzétételi iratban (Johnston-Wilson és munkatársai) különféle pszichiátriai és neurológiai elváltozások markereiként különféle agyfehérjéket ismertettek. A markerfehérjéket 2D (kétdimenziós) gélelektroforézissel azonosították.

Az EP 1 348963 A1 számú európai közzétételi iratban (Cochran és munkatársai) leírták, hogy a feszültség szabályozott káliumcsatorna 3.1 („voltage-gated potassium channel 3.1” Kv3.1) α -alegységét kódoló gén expressziója szkizofrénia esetén eltér, és e megfigyelésre alapozva diagnosztikai és szkrinelési eljárásokat ismertettek. Tudomásunk szerint ez az egyetlen olyan közlemény, amely egy káliumcsatorna-fehérje és a szkizofrénia közötti kapcsolattal foglalkozik.

A betegség természetét magyarázó elméletek egyike a dopaminerg rendszer kóros működésén alapul, különösen azon a megfigyelésen, hogy a szkizofréniás páciensekben a dopamin fokozott mértékben kötődik a dopaminreceptorok (DR) D2 alosztályához⁶. A szkizofrénia kezelésében jelenleg alkalmazott antipszichotikus drogok a DR-ek D2-alosztályának antagonistáiként hatnak⁷. Az US 4931270 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban (Horn és munkatársai) eljárásokat és jelzett vegyületeket ismertettek a D2 dopaminreceptor szkizofrénia esetében tapasztalható megváltozott megoszlásának kimutatására.

Neurotranszmitterek, neuropeptidok és a dopaminreceptor-gének D2 alosztályának (D₂, D₃, D₄ altípusok) immunsejtekben, főként periferiális vérből származó limfocitákban (PBL) történő expresszállására számos példát találhatunk az irodalomban^{1,4,8,9,10}. Úgy vélik, hogy ezek talán a megfelelő agyi receptorok

állapotát tükrözik vissza. Az utóbbi években figyelték meg azt, hogy a dopaminreceptor-gének D2 alosztályának D₃ altípusa szkizofrénia esetében túlexpresszállódik a PBL-ben, és így feltételezték, hogy ez a gén a szkizofrénia azonosítására és ellenőrzésére alkalmas marker lehet^{3,11}. Ugyanez a laboratórium közölte azt, hogy az α 7 nikotinos acetil-kolin receptort (α 7AChR) kódoló gén is eltérően expresszállódik a szkizofréniás páciensekben. A kóros PBL-ben az α 7AChR-t kódoló mRNA szintje alacsonyabb volt⁰. Mivel T-sejteken a dopamin közvetlenül lép kölcsönhatásba a DRD3-al és DRD2-vel és aktiválja az integrin által közvetített T-sejt-adhéziót, e gének T-sejtekben történő túlexpresszállása nemcsak passzív diagnosztikai marker lehet, hanem dinamikus funkcionális kölcsönhatást is tükröz.

Az utóbbi években a szekvenciaadatok mennyiségének gyors növekedése és génexpressziós mintázat analízisére kifejlesztett új molekuláris eljárások – így a nagy teljesítményű (mikromátrixokon, „microarray”-n alapuló technológia) vagy a pontosabb eljárások (kvantitatív valós idejű PCR) – az új molekuláris markerek fejlesztése terén ígéretesnek tűnnek.

Az EP 1 132 483 A2 számú európai közzétételi iratban (Nawa és munkatársai) a szkizofrénia esetén eltérően expresszálló fehérjék azonosítására szolgáló eszközként mikromátrixot alkalmaztak. Bár nagyszámú fehérjéről gondolták azt, hogy azok megfelelő markerek, de az említett leírás nem nyújt meggyőző bizonyítékot erre az elképzelésre.

A WO 0136473 számú nemzetközi közzétételi iratban (Vogeli és munkatársai) nagyszámú, G-fehérjéhez kapcsolt feltételezett receptoron végzett intenzív kísérletezést írtak le, azonban az expressziós analízis során csak néhány, mindössze a szekvenciák alapján azonosított receptorról feltételezték, hogy kapcsolatban állhat a szkizofréniával, de erről a feltételezésről közvetlen bizonyítékot nem szolgáltatottak.

Mikromátrixon alapuló megközelítést alkalmaztak akkor is, amikor szkizofréniás páciensekben G-fehérje-szignál 4 (RGS4) csökkent expresszióját figyelték meg (lásd WO 0216653 számú nemzetközi közzétételi irat).

Vawter és munkatársai egy családba tartozó öt szkizofréniás egyénből nyert PBL-eket szkrináltak egészséges egyénekével összehasonlítva abból a célból, hogy 1128 agyi eredetű gént tartalmazó mikromátrix alkalmazásával különböző mértékben expresszálló géneket azonosítsanak, de a mikromátrixon nem volt jelen DRD2 vagy Kir2.3³⁵.

Bár a technika jelenlegi állása szerint több lehetséges markergén ismert, továbbra is szükség van olyan gének azonosítására, amelyek lehetővé teszik a szkizofrénia diagnosztizálását vagy – ha ezeket más ismert markerekkel alkalmazzuk – fokozzuk a már létező eljárások megbízhatóságát.

A technika jelenlegi állása szerint, a kiterjedt vizsgálatok ellenére sem vetette fel senki, hogy a befelé irányító („inwardly rectifying”) káliumcsatornát kódoló gén a szkizofrénia markere lenne.

Ezenfelül, a technika jelenlegi állásában sem ismert a DRD2 génjének a szkizofrénia diagnosztizálására szolgáló markerként való alkalmazása.

Továbbá, az sem ismert, hogy az említett gének vagy az általuk kódolt fehérjék perifériális molekuláris markerek lennének a szkizofréniában.

A találmány szerinti megoldás célja szkizofrénia diagnosztizálására szolgáló eljárásokban alkalmazható diagnosztikai markerek azonosítása.

Több, szkizofrén személyből nyert PBL-ekben eltérően expresszáldó gén azonosítására nagy teljesítményű mikromátrixanalízist és kvantitatív, valós idejű PCR-t alkalmaztunk. A mikromátrixokkal végzett kísérletekben a DRD2 és Kir2.3 géneket találtuk túlexpresszálnak. A DNS-mikromátrixokkal azonosított két génre vonatkozó eredményeket SybrGreen- és TaqMan-próbák alkalmazásával végzett kvantitatív, valós idejű PCR-rel igazoltuk. Mivel sem a szkizofrén, sem pedig a nem szkizofrén egyének nem álltak antipszichotikus vagy más gyógyszeres kezelés alatt, a DRD2- és Kir2.3-mRNS csökkent szintje önmagában nem a gyógyszerelés hatását, hanem az elválást tükrözi. Több perifériális molekuláris genetikai marker kombinációja különösen alkalmas lehet a szkizofrénia pontos, korai diagnosztizálásában és a hatékony terápia kiválasztásában.

Az alábbiakban röviden leírjuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány tárgya eljárás szkizofrénia diagnosztizálására egy adott alanyban, amely eljárás során:

- az alanytól vett perifériás vérből származó limfocitákban (PBL-ben) meghatározzuk az alábbi gének közül legalább egynek a génexpressziós szintjét:

DRD2-t (dopamin D2 receptor) kódoló gén és/vagy

Kir2.3-at (befeled irányító káliumcsatorna 2.3) kódoló gén;

és

- a perifériás vér limfocitaiban mért expressziós szintet összehasonlítjuk a megfelelő gének egészséges alanyokban mérhető átlagos expressziós szintjével,

ahol a PBL-ben talált magasabb génexpressziós szint jelzi, hogy az alany szkizofréniás vagy arra fogékony.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, a fenti eljárásban az expressziós szint megállapítását a biológiai mintából nyert nukleinsav, előnyösen mRNS vagy cDNS, nukleinsavhibridizációs próbával történő hibridizálásával végezzük, ahol a nukleinsav szekvenciája:

DRD2-t (dopamin D2 receptor) kódoló gén és/vagy

Kir2.3-at (befeled irányító káliumcsatorna 2.3) kódoló gén,

azok része,

vagy a fentiek bármelyikével komplementer szekvencia.

Előnyös, ha a biológiai mintából nyert nukleinsav mRNS vagy cDNS.

A találmány előnyös megvalósítási módjában az expressziós szintet mikromátrixanalízissel határozzuk meg.

Előnyös, ha az expressziós szintet PCR-eljárással, előnyös, ha valós idejű PCR-eljárással, előnyösebb, ha kvantitatív valós idejű PCR-eljárással határozzuk meg.

A biológiai minta perifériális vérből származó sejtet, előnyösen limfocitákat tartalmaz, és a génexpressziós szintet e sejtekben határozzuk meg.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya az alábbiak közül legalább egyhez specifikusan kötődni képes vegyület alkalmazása szkizofrénia diagnosztizálására:

DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy

Kir2.3-at kódoló nukleinsav.

A találmány előnyös megvalósítási módjában a vegyület a DRD2-t vagy Kir2.3-t kódoló nukleinsavak, azokkal komplementer nukleinsavak vagy mindezek részei bármelyikéhez specifikusan hibridizálni képes oligonukleotid. Előnyös, ha az oligonukleotid jelölést tartalmaz. Előnyös, ha a jelölés fluoreszcens vagy radioaktív jelölés. Igen előnyös, ha a próba fluoreszcens jelölést vagy kioltóanyagot („quencher”) tartalmaz.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a vegyület PCR-ben alkalmazható oligonukleotid-láncindító.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya egy adott alanyban a szkizofrénia diagnosztizálására szolgáló diagnosztikai készlet és annak alkalmazása, amely készlet tartalmazza az alábbiakat: legalább egy, az alábbiak közül legalább egyet megkötni képes vegyület:

DRD2 vagy azt kódoló nukleinsav és/vagy

Kir2.3 vagy azt kódoló nukleinsav

és

mód a vegyület specifikus kötődése esetén kimutatható jel előállítására.

A találmány előnyös megvalósítási módjában a kimutatható jel előállításának módja lehet jelölés, előnyösen enzim jelölés, fluoreszcens jelölés vagy radioaktív jelölés.

A találmány előnyös megvalósítási módjában a vegyület lehet a nukleinsavak, azok komplementerei vagy részei bármelyikéhez specifikusan hibridizálni képes oligonukleotidot tartalmazó próba. A próba tartalmazhat oligonukleotidot és ahhoz kötött jelölést. A találmány előnyös megvalósítási módjában a jelölés fluoreszcens jelölés és előnyös, ha a próba fluoreszcens jelölést vagy kioltóanyagot tartalmaz.

A találmány további megvalósítási módjában a próba oligonukleotid és a jelölés kelátképző vegyület, például SybrGreen vagy etidium-bromid.

Előnyös, ha a diagnosztikai készlet tartalmaz még a nukleinsavak közül legalább egynek az amplifikálására alkalmas oligonukleotid-láncindító párt.

A készletben a specifikus kötődés kimutatásának módja lehet az antitesthez kapcsolt jelölés vagy további, az első antitesthez kötődni képes, jelzett antitest.

A találmány további szempontja szerint a találmány tárgya egy adott alanyban a szkizofrénia diagnosztizálására szolgáló oligonukleotidpróba, amely próba az alábbiakat kódoló nukleinsavak közül legalább eggyel specifikusan hibridizálni képes:

DRD2 és/vagy Kir2.3,
vagy azok komplementere vagy része.

Előnyös, ha a találmány szerinti próba az oligonukleotidhoz kötve fluoreszcens jelölést, és előnyösen kioltó anyagot tartalmaz.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya eljárás a szkizofrénia tüneteit módosító, potenciális terápiás vegyület szkrinelésére, amely eljárásban a vegyületet az alábbi nukleinsavak közül legalább eggyel érintkeztetjük:

DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy
Kir2.3-at kódoló nukleinsav,
és meghatározzuk a vegyület hatását,

ahol a nukleinsavak vagy fehérjék bármelyikének működését befolyásoló vegyületet a szkizofrénia szimptómáit módosító, potenciális vegyületnek tekintünk.

A találmány szerinti előnyös eljárásban a kérdéses vegyületet az alábbiak közül legalább eggyel érintkeztetjük:

DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy
befelé irányító káliumcsatornát (Kir2.3) kódoló nukleinsav,
a nukleinsava(ka)t expresszáló sejtben,
és meghatározzuk és kiértékeljük a vegyületnek a nukleinsav(ak) expressziós szintjére kifejtett hatását,
ahol az expressziós szintet csökkentő vegyületet a szkizofrénia gyógyítására szolgáló potenciális vegyületnek tekintjük.

A találmány további megvalósítási módjában a kérdéses vegyületet a szkizofrénia, az alábbiak közül legalább egyet túlexpresszáló állatmodelljének adjuk be:

DRD2 vagy azt kódoló nukleinsav és/vagy
Kir2.3 vagy azt kódoló nukleinsav,
és meghatározzuk a vegyület szkizofréniával kapcsolatos szimptómáira kifejtett hatását.

Definíciók

A leírás szerinti értelemben, az „alany” kifejezés személyt vagy állatot jelent. Alany lehet olyan páciens, akinek az adott elváltozása van vagy feltételezik, hogy van, illetve lehet egészséges személy vagy állat, aki (amely) igény szerint kontroll lehet.

A leírás szerinti értelemben, a „biológiai minta” kifejezés bármilyen, egy adott alanytól vett – igény szerint a vizsgálatra processzált vagy emésztett vagy előkészített – testfolyadékot vagy szövetet jelent, és amely tartalmaz fehérjemarkert és/vagy a markert kódoló nukleinsavat és/vagy a fehérje szubsztrátumát és/vagy a marker által termelt termékeket. Ezenfelül, biológiai minta lehet még sejtenyészet, például a páciens sejteinek tenyésztésével kapott elsődleges sejtenyészet.

A leírás szerinti értelemben, a „biológiai mintából nyert nukleinsav” kifejezés olyan nukleinsavat jelent, amely a minta egyik komponense, de amelyet a további

vizsgálatok számára hozzáférhetővé tettünk, például a nukleinsav bizonyos mértékű tisztításával vagy izolálásával.

A leírás szerinti értelemben, az „immunsejt” olyan sejt, amely csontvelőből származó őssejtből ered. Előnyös immunsejtek mielinből vagy nyirokból származnak. Az immunsejtek például limfociták, természetes ölősejtek (NK-sejtek), leukociták, granulociták, monociták, például fagociták stb.

A leírás szerinti értelemben, egy adott anyag „izolálása” kifejezés a kérdéses anyag eredeti környezetének ember általi megváltoztatását jelenti.

A leírás szerinti értelemben, a „próba” olyan vegyület, amely képes reakcióba lépni a vizsgálni kívánt molekulával (azaz a célmolekulával) vagy ahhoz kötődni. Előnyös, ha a próbát úgy tervezzük, hogy a biológia molekulával való reakció vagy a mintához való kötődés esetén a próba résztvegyen a jelkibocsátásban.

Nukleinsavak kimutatására előnyös próbák oligonukleotidot tartalmaznak (oligonukleotidpróbák), például fluoreszcens próbák. Igen előnyösek az olyan típusú próbák, amelyek fluoreszcens festéket és olyan kioltóanyagot tartalmaznak, amelyek fluoreszcens rezonancia-energiatranszferre képesek, ha a próba a célmolekulához kötődik (például TaqMan-próbák). Ilyen próbák speciális típusai például a molekuláris „fényjelek” („beacon”).

Egy adott gén „expressziós szintje” az expresszió bármely olyan, félkvantitatív vagy kvantitatív módon történő becslését vagy megállapítását jelenti, amely alkalmas az expressziós szintek összehasonlítására különböző minták vagy alanyok esetén. Hasonlóképpen, egy adott fehérje „szintje” a fehérje koncentrációjának, mennyiségének, hatásának vagy aktivitásának olyan, félkvantitatív vagy kvantitatív módon történő becslését vagy megállapítását jelenti, amely alkalmas a szintek összehasonlítására különböző minták vagy alanyok esetén.

A leírás szerinti értelemben, a „specifikus hibridizáció” kifejezés valamely poli- vagy oligonukleotid, szekvenciahasonlóság eredményeként, meghatározott körülmények közötti kötődését jelenti egy másikhoz. A találmány előnyös megvalósítási módjában sztringens körülményeket alkalmazunk. Előnyös, ha a kötődés kimutatható, például a kettős szálú DNS kimutatására szolgáló módokon.

A „DRD2” (dopamin D2 receptor) a dopaminreceptor D2 altípusát jelenti. Ez a G-fehérjéhez kapcsolt receptor gátolja az adenilil-cikláz aktivitását.

A fehérje szekvenciája ismert, például a PubMed Protein Database-ból az alábbi azonosító számokon: BC021195.2, P14416, NP_057658.

A mRNS szekvenciája ismert, például a PubMed Nucleic Acid Database-ból az alábbi azonosító számokon: X51645, M30625

Továbbá, a DRD2 receptorfehérje és az azt kódoló nukleinsav az irodalomból is ismert^{36,37,38,39,40,41}.

A befelé irányító K⁺-csatornák közé tartozó „Kir2.3” (befelé irányító káliumcsatorna 2.3) a G-fehérjék által szabályozott, membránba integrálódott fehérje, amely

elsősorban a kálium sejtbe történő beáramlását és nem a kiáramlását teszi lehetővé. Ez a káliumion-vezetőképességben fennálló aszimmetria kulcsszerepet tölt be az izomsejtek és idegsejtek ingerelhetőségében. A Kir2.3 feszültségtől való függőségét a sejten kívüli káliumkoncentráció szabályozza úgy, hogy ha a sejten kívüli káliumkoncentráció nő, akkor a csatorna nyitódásának feszültségtartománya eltolódik a pozitív feszültségek irányába.

A fehérje aminosavszekvenciája például az Entrez Protein Database-ban, például az alábbi katalógusszámokon található meg: P52190, NP_690607, NP_004972, Q64198, P52189, P48050, AAG17049, AAG53738

A Kir2.3-at kódoló nukleinsavszekvenciák az Entrez Nucleotides Database-ban, például az alábbi katalógusszámokon található meg: mRNA: NM_152868, NM_004981 (human); cDNS: AF187874, AF183917 (domestic guinea pig; *Cavia porcellus*).

Továbbá, Kir2.3 receptort és azt kódoló nukleinsavat ismertetik az következő publikációk^{42,43,44,45}.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat.

1. ábra: A DRD2 és a Kir2.3 gének relatív expressziós szintjének variációját a kontrollmintákban. A relatív expressziós szintek $\log_2$ arányokként vannak ábrázolva az Y tengelyen. A vonalkázott és a fehér oszlopok a Kir2.3-gén expresszióját mutatják SybrGreen-festék, illetve TaqMan-protokoll alkalmazásával. A szürke és a fekete oszlopok pedig a DRD2 gén expresszióját mutatják SybrGreen-festék, illetve TaqMan-próba alkalmazásával (MC, férfi kontroll; FC, női kontroll).

2. ábra. A DRD2 (A) és a Kir2.3 (B) gének relatív expressziós szintje a szkizofrén betegek-ből származó mintákban. A relatív expressziós szintek $\log_2$ arányokként vannak ábrázolva az Y tengelyen. A fehér és fekete oszlopok a SybrGreen-festéken, illetve TaqMan-protokollon alapuló QRT-PCR-adatokat mutatják. A szürke oszlopok a DRD2 és Kir2.3 gének cDNS a mikromátrixeljárással analizált, relatív expresszióját mutatják. (A) A fehér pontozott vonal ($\log_2$ arány=1,4) és a fekete szaggatott vonal ($\log_2$ arány=1,3) a DRD2 gén kontrollmintákon mért háttér expressziós szintjét mutatja. (B) A fehér pontozott vonal ($\log_2$ arány=1,8) és a fekete szaggatott vonal ($\log_2$ arány=1,5) a Kir2.3 gén kontrollmintákon mért háttér expressziós szintjét mutatja. (M, férfi páciens; F, női páciens).

3. ábra. Az expressziós adatokon alapuló hierarchikus klaszterezés világosan elkülönít két fő klasztert: az egészséges kontrollt és a beteg mintákat (MC, férfi kontroll; FC, női kontroll; M, férfi páciens; F, női páciens)

A találmány szerinti megoldás részletes ismertetése

A találmány alábbi, bizonyos megvalósítási módjait példák segítségével részletesebben bemutatjuk, azonban egyértelmű, hogy a találmány oltalmi köre nem korlátozódik ezekre a példákra.

A találmány a szkizofrénia diagnosztizálására szolgáló új, biokémiai eljárásokkal foglalkozik, és azon a megfigyelésen alapul, hogy a dopamin D2 receptor és a befelé irányító káliumcsatorna Kir2.3 expressziója szkizofrénias páciensekben fokozólag szabályozott („upregulated”).

A DR-ek D2 alosztályába tartozó, G-fehérjéhez kapcsolt DRD2 gátolja az adenil-cikláz-aktivitását⁰. A receptor által aktivált G-fehérjék egyes befelé irányító káliumcsatornákat aktiválhatnak (Kir3.1), másokat inaktívalhatnak (Kir2.3)^{0,0}. Számos különféle káliumcsatornáról ismert, hogy részt vesz az idegrendszer elektromos jelátvitelében. A Kir2.3 a nagy káliumbéramlást és kis káliumkiáramlást hordozó, konstitutívan aktív, inward rectifier K^+ -csatornák családjába tartozik⁰. Ez a káliumion-vezetőképességben fennálló aszimmetria kulcsszerepet tölt be az izomsejtek és idegsejtek ingerelhetőségében. Patkányok Soemmering-állományában (*substantia nigra*) lévő neuronokban a DR-ek DA-D2 alosztálya közvetlenül aktiválja az IAP-ra [„islet activating protein” (szigetaktiváló fehérje), pertussis toxin] érzékeny G-fehérjéhez kapcsolt befelé irányító káliumcsatornákat⁰. Lavine és munkatársai kimutatták, hogy a DRD2 és egy másik befelé irányító káliumcsatorna Kir3 stabil, funkcionális komplexet alkot in vitro és in vivo⁰. Bár a találmányt nem kívánjuk semmiféle mögöttes elméletre korlátozni, ezen eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a DR-k és az befelé irányító káliumcsatornák szoros kapcsolatban állnak.

A találmány egyik megvalósítási módjában, egy adott alanytól vett biológiai mintában megállapítjuk a DRD2-t kódoló gén vagy pedig a Kir2.3-at kódoló gén, vagy mindkettő expressziós szintjét. A biológiai mintában mért expressziós szintet összehasonlítjuk a megfelelő gének egészséges alanyokban mérhető átlagos expressziós szintjével. Ha a biológiai mintában génextpressziós szint magasabb, mint az átlagos szint, akkor levonjuk azt a következtetést, hogy az alany szkizofrénias vagy arra fogékony.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, egy adott alanytól vett biológiai mintában megállapítjuk a DRD2 fehérje vagy a Kir2.3 fehérje, vagy mindkettő szintjét. A biológiai mintában mért fehérje(ék) szintjét összehasonlítjuk a megfelelő gének egészséges alanyokban mérhető átlagos szinttel. Ha a biológiai mintában a szint magasabb, mint az átlagos szint, akkor levonjuk azt a következtetést, hogy az alany szkizofrénias vagy arra fogékony.

Hangsúlyozni kívánjuk azonban azt, hogy a szkizofrénia más markerei is ismertek a technikában, amelyeket a leírás bevezető részében soroltunk fel. A leírásban ismertetett új markerek a más ismert markerekkel együtt alkalmazhatók, ezáltal a diagnózis megbízhatósága fokozható.

Az expresszió alapszintje lehet ugyanezen gén egészséges – azaz nem szkizofrén – alanyban mérhető expressziós szintje. Előnyösebb, ha az alapszintet az egészséges alanyok alkotta referenciacsoportban mérhető átlagos expressziós szintként határozzuk meg. Tanácsos lehet az, hogy a referenciacsoportot gondosan válasszuk meg és a csoportot alkotó alanyok és a diagnosztizálni kívánt alany bizonyos jellemzőket tekintve, például rassz, kor, nem stb., megegyeznek, bár eredményeink szerint az egészséges egyének közötti variációk általában kisebbek, mint az egészséges és szkizofrén alanyok között. Előnyös, ha az alapszintet megfelelő kontrollhoz, például belső referencia kontrollhoz képest határozzuk meg. Esetleg, általánosabb alkalmazás esetén, a referenciacsoportba válogatott alanyoknak – a kor, nem, szociális helyzet, földrajzi eloszlás, korábbi drog- és kórtörténet tekintetében – elegendően sokfélének kell lenniük, és a referenciacsoportnak megfelelő méretűnek kell lennie ahhoz, hogy statisztikailag értelmezhető értéket kapjunk. Így, a találmány szerinti diagnosztikai markerek vagy fehérjék expresszióját a „normális” populációt reprezentáló mintakészletben mérjük. Az alapértéket ezen eredmények statisztikai értékelésével számítjuk ki.

Biológiai mintát vehetünk a találmány szerinti markergén vagy fehérje differenciális expresszióját mutató bármely szövetből. Ilyen szövet – bár nem kizárólag és nem akármilyen körülmények között – az agyból, gerincvelőből, nyirokfolyadékból, vérből stb. származó szövet. Eljárások mintavételre és -feldolgozásra jól ismertek a technika állása szerint.

A szakember már régóta több eljárást is ismer a fehérjék szintjének vagy a génexpresszió szintjének kvantitatív meghatározására egy adott mintában. A találmányban alkalmazhatók mindezen eljárások.

A találmány egyik megvalósítási módjában, a kimutatási rendszerben a kérdéses RNS-molekulából cDNS-molekulát szintetizálunk (például az RNS-molekulából reverz transzkripcióval cDNS-t készítünk), és a cDNS-ben belüli szekvenciát nukleinsavamplifikációs reakcióban – például PCR-amplifikációs reakció, vagy hasonló – templákként alkalmazzuk. A reverz transzkripcióban és az eljárás nukleinsavamplifikációs lépéseiben láncindítóként alkalmazott nukleinsavreageneket választunk. Szakember számára ismertek alkalmas láncindítók tervezésére és előállítására szolgáló eljárások (lásd példák).

Továbbá, génexpressziós vizsgálatot *in situ* – azaz közvetlenül a páciens szövetéből biopsziával vagy reszekciókkal nyert, fixált és/vagy fagyasztott szövetmetszen – is végezhetünk, így nem szükséges nukleinsavat preparálni. Nukleinsavreageneket alkalmazhatunk próbaként és/vagy láncindítóként az ilyen *in situ* eljárásokhoz. Esetleg, ha a megfelelő sejtből elegendő mennyiséget lehet nyerni, standard Northern-blot-analízist végezhetünk a markergének mRNS expressziója szintjének meghatározására.

Azonban, jelenleg egy bizonyos viszonylag új eljárás széles körű alkalmazhatósága kezd elterjedni.

Ahogy az alábbi példákkal bemutatjuk, az alapszint megállapítására szolgáló egyik eljárásban valós idejű kvantitatív PCR-t (RT-PCR) alkalmazunk. A szakember különféle RT-PCR eljárásokat ismer, így például a Real Time PCR Special Issue of the METHODS Journal (Elsevier, Dec 2001, 25. köt., 4. kiadás, 383–481) kiadványban ismertetett eljárás.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, fehérjeszintek meghatározásához DRD2-t vagy Kir2.3-at specifikusan felismerni képes antitesteket állítunk elő. Az antitesteket egymagukban vagy kombinációban alkalmazzuk. A fehérjét specifikusan felismerő antitest kötődésének szintje magasabb a szkizofrén egyénekben, mint a normális egyénekben. Kir2.3 elleni antitest ismertetnek például Noam és munkatársai⁴⁶.

A szövetben lévő fehérje teljes mennyiségéhez való kötődés szintjének normalizálására a specifikus antitestek kötődését az egészséges és beteg alanyokban egyenlő mértékben expresszálódó referenciafehérjéhez viszonyítva adhatjuk meg.

A találmány alternatív megvalósítási módjában, a módosított és módosítatlan receptorok mennyiségének meghatározása történhet izolálással, például a receptorfehérje vagy a káliumcsatornát alkotó fehérje részleges izolálásával. Az izolálás hatékony módja a gélelektroforézis, például kétdimenziós gélelektroforézis, vagy izoelektromos fókuszálási eljárások. Ezen eljárások kombinálása blotoló eljárásokkal vagy más immunológiai kimutatási eljárásokkal hatékony lehetőséget biztosíthat egy adott mintában a fehérjék koncentrációjának megállapítására. Az izolált és részlegesen tisztított fehérjéket – például proteolitikus enzimekkel végzett – peptidfragmentum-analízisnek is alávetethetjük, amelyben speciális tulajdonságokat hordozó fragmentumokat, például esetleg specifikus kémiai módosításokra alkalmas helyet tartalmazó fragmentumokat állítunk elő.

A találmány alternatív megvalósítási módjában, a DRD2 marker receptorfehérje vagy a Kir2.3 káliumcsatorna aktivitását a kérdéses fehérje szintjét indikáló értékként mérjük. A befelé irányuló K⁺-áramok meghatározására szolgáló eljárások és a Kir2.3 kimutatására szolgáló más eljárások ismertek (például Noam és munkatársai⁴⁶ és Bannister és munkatársai⁴⁷ és a leírásban már említett publikációk).

Amikor a markerfehérje vagy a markergén szintjét meghatároztuk és az alapértékkel összehasonlítottuk, megállapítható egy bizonyos küszöbérték, amely feletti értékek a diagnosztizált alanyokban a szkizofréniát jelzik. E küszöbérték különféle faktoroktól függ, így a mérési eljárástól, az alapszint megbízhatóságától, statisztikai (matematikai) tényezők és a diagnózis célja (azaz, hogy a betegség kifejlődését bizonyossággal kell-e megállapítani vagy csak a fogékonyságról kell meggyőződni) stb. Mint extrém érték, az alapvonal egybeeshet a küszöbértékkel. Ha a meghatározott szint e küszöbérték fölé esik, akkor az jelezheti a betegség súlyosságát.

Előnyös, ha egy adott eljárás optimalizálása során a teszt megbízhatóságának meghatározására egy sor beteg alanyt is vizsgálunk a betegekből származó min-

tákból és a normális mintákból kapott eredmények összehasonlításával.

A diagnosztikai készletek a technikában ismertek. Konkrétan, számos, elérhető és a technikában leírt diagnosztikai készletre hivatkozunk a leírásban. E készletek bármelyike alkalmazható a találmány szerinti készletek analógjaként, ha számításba vesszük a találmány itt ismertetett specifikus tulajdonságait.

A vizsgálatot az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA–2001, T38373), az Oktatási Minisztérium (NKFP–2002 5/0079) és a Miniszterelnöki Hivatal és a Magyar Tudományos Akadémia között bilaterális ösztöndíja támogatta. L. G. P.-t az Oktatási Minisztérium Bólyai János ösztöndíja támogatta.

Példák

Anyagok és eljárások

Páciensek

Pácienseket a Pszichiátriai Osztály fekvőbeteg egységéből verbuváltunk és tőlük írásos beleegyezést kaptunk a vizsgálat ismertetése után. Minden páciens alapos orvosi vizsgálaton – így testi és idegrendszeri vizsgálaton – és rutin laboratóriumi vizeletvizsgálaton is átesett. Minden pácienssel a Mini International Neuropsychiatric Interview Plus-t (MINI PLUS)⁰ végeztük el, és e páciensek mindegyikében szkizofréniát vagy szkizofrénia jellegű pszichózist diagnosztizáltunk a DSM-IV szerint⁰. Pszichiátriai tünetjeiket a Pozitív és Negatív Szindróma Skála [Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)]⁰, a Klinikai Összbenyomás [Clinical Global Impression (CGI)] és a Működés Globális Felmérése [Global Assessment of Functioning (GAF)] skála alkalmazásával állapítottunk meg⁰. A klinikai osztályozást két képzett pszichiáter végezte. A vizsgálatot a Helsinki Egyezmény (Declaration of Helsinki) összhangban végeztük. Demográfiai és orvosi adatokat a 2. táblázatban részleteztünk. 7 nő és 6 férfi gyógyszerrel még nem kezelt, illetve gyógyszermentes, szkizofréniával diagnosztizált beteget és 5-5 férfi, illetve nő egészséges kontroll egyént vizsgáltunk meg.

Limfocita- és RNS-preparálás szkizofréniapáciensekből és kontroll egyénekből

10 ml teljes vért EDTA-t tartalmazó csőbe gyűjtöttük, 5 percig 1500 fordulattal centrifugáltuk és a limfocitafrakciót összegyűjtöttük. A sejteket vörösvértest-lízis-pufferrel (5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=7,0, Promega, Madison, WI, USA) 3-szor mostuk az eritrociták lizálása céljából. A tiszta limfocitaüledékből RNS-t izoláltunk a Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Düren, Germany) cég által forgalmazott RNS-tisztító készlettel a mellékelt útmutató szerint. Az RNS-mintákat 30U Prime RNAáz-inhibitor (Eppendorf) jelenlétében –80 °C-on tároltuk. A tisztított RNS minőségét agarózgél-elektroforézissel, mennyiségét spektrofotometriával (NanoDrop, Rockland, DE, USA) ellenőriztük.

Mikromátrixok, próbakészítés és hibridizáció

A Matchmaker könyvtárból (Clontech, BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) származó 3200 emberi

limfocitából vett cDNS inzertet és pBluescript SK II (–) plazmidban készített, kevert emberi könyvtárból származó, igazolt szekvenciájú klónokat (New England Biolabs, Hertfordshire, England) plazmidra specifikus láncindítókkal PCR-rel amplifikáltunk és MultiScreen-PCR lemezekre (Millipore Billerica, MA, USA) tisztítottunk, 50% dimetil-szulfoxid/víz oldatban felfüggesztettük és FMB cDNS-lemezekre (Full Moon Biosystems, Sunnyvale, CA, USA) MicroGrid Total Array System (BioRobotics, Cambridge, UK) robot segítségével. A lemezek utókezelése és a blokkolás a korábban leírtak szerint történt²⁴. Próba előállításához 2 µg teljes RNS-t (14 szkizofréniás páciensből) reverz transzkripcióval cDNS-sé írtunk át poly-dT primed Genisphere Expression Array 350 Detection Kit rendszer (Genisphere, Hatfield, PA, USA) alkalmazásával a gyártó útmutatásait követve. A befogószekvenciát tartalmazó cDNS-t a 3200 emberi cDNS-klónt tartalmazó, emberi cDNS mikromátrixra hibridizáltuk. Az első lépésben végzett cDNS-hibridizáció és a második, befogó reagens hibridizációs lépés Ventana-hibridizáló állomásban (Ventana Discovery, Tucson, AZ, USA) történt az „antitest” protokoll alkalmazásával. Az első hibridizálást 40 °C-on 6 órán át, „Chiphyl” hibridizációs pufferben (Ventana) végeztük, majd a lemezekhez 200 µl, 2,5 µl Cy5 és 2,5 µl Cy3 befogóreagenst tartalmazó „Ribohyb” hibridizációs puffert (Ventana) adtunk és 42 °C-on 2 órán át inkubáltuk. A hibridizálás után a lemezeket 0,2×SSC-vel kétszer, 10 percig mostuk, szárítottuk és szkenneltük. A szkennelés és adatanalízis a korábbiakban leírt módon történt⁰.

Valós idejű PCR

Valós idejű PCR-hez, 1 µg egyedi beteg és kontrollmintából származó teljes RNS-t SuperScript II RNáz H⁻ reverz transzkriptázzal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) cDNS-sé írtunk át. A reakció 5 µM random hexamer primer, 1×First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH=8,3) 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 500 nM dNTP mix (500 nM mindegyikből) 0,01 M DTT, 40 E Prime RNáz-inhibitor (Eppendorf) és 200 E SuperScript II RNáz H⁻ reverz transzkriptáz (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) jelenlétében, 20 µl végtérfogatban, 42 °C-on 2 órán keresztül zajlott. A reverz transzkripciót (RT) megelőzően az RNS és a Random primer elegyét 65 °C-on 5 percig denaturáltuk. A reakciót a reverz transzkriptáz enzim 15 perces, 70 °C-on történt inaktiválásával állítottuk le. A négyeszeresére hígított RT-reakcióból 1 µl-t használtunk mind a SybrGreen-festéken, mind a TaqMan-próbán alapuló QRT-PCR-reakcióhoz. A SybrGreen-festéken alapuló QRT-PCR-reakcióhoz az ABGene ABsolute QPCR SybrGreen-mix-ét (ABGene, Surrey, UK) és a Corbett Research RotorGene QRT-PCR gépét használtuk (Corbett Research, Mortlake, Australia) a gyártó útmutatásai szerint a láncindítókat 150 nM végkoncentrációban alkalmazva az alábbi körülmények között: 15 perc 95 °C, majd 45 cikluson keresztül 95 °C 15 s, 60 °C 25 s és 72 °C 25 s. A SYBRGREEN-festék fluoreszcenciaintenzitását a ciklusok során minden amplifikációs lépés

után detektáltuk. Minden reakció után ellenőriztük a keletkező termékek olvadási hőmérsékletét. A TaqMan-próbán alapuló PCR-reakciókhoz az ABGene ABsolute QPCR (ABGene, Surrey, UK) mixét használtuk a gyártó utasítása szerint. A reakció során végkoncentrációban 300 nM primert és 250 nM TaqMan-próbát alkalmaztunk a következő reakcióparaméterek mellett: 15 perc 95 °C, majd 45 cikluson keresztül 95 °C 15 s, 60 °C 1 perc. A fluoreszein festék (FAM) intenzitását minden ciklus után detektáltuk. A PCR-primerek és a TaqMan-próbákat a Primer Express (Applied Biosystems) tervező programmal terveztük. A vizsgálatban al-

kalmazott primerek és a próbák szekvenciáit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az 5'-végén Fluorescein, a 3'-végén Dabsyl fluoreszcens festékkel jelölt, kettős jelölésű TaqMan-próbákat a Bioneer cég (Daejeon, Korea) gyártotta. A láncindítók minőségét a Bioneer által biztosított MA-analízissel ellenőriztük. Az egyes PCR-futtatásokhoz nem templát kontrollmintát alkalmaztunk a cDNS-templátot szennyező genomikus eredetű DNS-ek kiszűrésére. Az eredmények kiértékeléséhez a Pfaffl-módszert alkalmaztuk⁰. E számítási eljárással helyesbíthetők az amplifikációs reakciók hatékonyságának különbözőségéből eredő eltérések.

1. táblázat

Rövid név	PCR-láncindítók	TaqMan-próba	A gén neve	Katalógusszám
DRD2	előre CTGCTCATCGCTGT-CATCGT	TCGGCAACGTGCTGGTGTGCA	emberi D2 dopaminreceptor	X51362
	vissza CTCGCGGGACACAGCC			
Kir2.3	előre CTTCCCCCACTGACTCTT-CAAG	TGCCCTCTTTGCTCTCAGAACCTTGG	<i>Homo sapiens</i> befelé irányító káliumcsatorna (Kir2.3)	NM_004981
	vissza CCAGCAGTCCAGC-CACCTT			
Aktin	előre TCACCGAGCGCGGCT	CAGCTTCACCAACACGGCCGA	emberi β -aktin (ACTB)	NM_001101
	vissza TAATGTCACGCAC-GATTCCC			
HPRT	előre TGACACTGGCAAAA-CAATGCA	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGGCAGTATAATCCA	emberi hipoxantin foszforibozil-transzferáz (HPRT)	M31642.
	vissza GCTTGCGACCTTGAC-CATCT			

Statisztikai analízis

Párosítatlan Student-féle t-tesztet alkalmaztunk a p érték meghatározásához. A génexpressziós adatakhoz egymáshoz hasonló megfigyelési csoportokba történő szétválogatására agglomeratív hierarchiális klaszterezést alkalmaztunk. A használt eljárás a csoportátlag-eljárás volt. Euklideszi metrikus (a különbségek négyzetgyökének összege) eljárást alkalmaztunk a megfigyelések közötti eltérések kiszámítására. A számítási eljárást tartalmazza az R1.8.1 statisztikai szoftver.

40

Eredmények

Vizsgálataink során 13 gyógyszermentes, illetve gyógyszerrel hosszabb ideje nem kezelt szkizofrén beteget (7 nő és 6 férfi, 23–67 éves korú, átlag 34 $\pm$ 12 év), és 10 kontrollegyént (5 nő és 5 férfi, 28–65 éves korú, átlag 38 $\pm$ 10 év) vizsgáltunk a szkizofrénia új, perifériális markereinek azonosítása érdekében. A betegek és a kontrollegyének demográfiai adatait a 2. táblázat tartalmazza. A kísérletek során sem a beteg sem az egészséges kontrollegyének nem álltak sem antipszichotikus sem egyéb gyógyszeres kezelés alatt.

45

50

2. táblázat

Páciensek	Helyzet (drogmentes időszak)	Kor	A betegség időtartama	PANSS				CGI	GAF	Mintavétel idején szedett gyógyszer		
				pozitív	negatív	össz	Σ			APS	ANX	egyéb
Férfi 2	F (1 hónap)	34	3 év	26	25	55	106	4	50	Ø	Ø	Ø
Férfi 3	N	34	6 hónap	25	21	36	82	4	40	Ø	Ø	Ø

2. táblázat (folytatás)

Páciensek	Helyzet (drogmentes időszak)	Kor	A betegség időtartama	PANSS				CGI	GAF	Mintavétel idején szedett gyógyszer		
				pozitív	negatív	össz	Σ			APS	ANX	egyéb
Férfi 4	F (4 hónap)	36	4 év	33	31	65	129	6	25	Ø	Ø	Ø
Férfi 6	N	25	4,5 év	29	36	66	131	6	20	Ø	Ø	Ø
Férfi 7	N	25	7 hónap	34	32	74	140	6	20	Ø	Ø	Ø
Férfi 8	N	24	6 hónap	14	37	49	100	5	25	Ø	Ø	Ø
Nő 1	F (3 hónap)	46	15 év	31	25	58	114	6	30	Ø	Ø	Ø
Nő 2	F (3 hónap)	34	14 év	34	40	85	159	7	15	Ø	Ø	Ø
Nő 3	F (1 év)	67	17 év	29	28	51	108	5	30	Ø	Ø	Ø
Nő 4	F (1 év)	29	5 év	29	30	54	113	6	30	Ø	Ø	Ø
Nő 5	N	27	9 hónap	40	34	81	155	7	15	Ø	Ø	Ø
Nő 6	N	33	8 hónap	22	23	54	99	4	40	Ø	Ø	Ø
Nő 8	N	23	3 hónap	22	28	62	112	5	30	Ø	Ø	Ø

N: gyógyszermentes, F: gyógyszerrel hosszabb ideje nem kezelt,

PANSS: Positive And Negative Syndrome Scale,

pozitív: pozitív szindróma jel,

negatív: negatív szindróma jel,

global: global syndrome items,

Σ : PANSS összes pontszám,

CGI: Clinical Global Impression,

GAF: Global Assessment of Functioning,

APS: antipszichotikum,

ANX: anxiolitikum.

Előzetes szkrínelés cDNS mikromátrixanalízissel

cDNS mikromátrixanalízist alkalmazva előzetes szűrést végeztünk a kontrollhoz képest eltérő expressziós mintázati gének azonosítására a szkizofrén PBL-ben és potenciális periferális markergének azonosítása céljából. Megváltozott expressziós sajátosságú géneket SybrGreen-festék és kétszeresen jelzett TaqMan-próbák alkalmazásával végzett QRT-PCR-rel további analízisnek vetettük alá. Tizenhárom betegből és 10 kontrollgyénből származó kevert RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk és 3200 humán cDNS-klónt tartalmazó cDNS mikromátrixra hibridizáltunk. Azokat a pozitív klónokat, melyek a kontrolloknál kétszeres nagyobb fokozott expressziót mutattak, megselezkenáltuk. A DRD2 esetében $2,56 \pm 0,26$ -szoros, míg a Kir2.3 esetében $6,75 \pm 2,3$ -szoros géntúlműködést detektáltunk az egészséges egyénekhez képest. (2. ábra). Ezen előzetes adatok alapján és figyelembe véve azt, hogy e gének milyen potenciális szerepet játszhatnak a szkizofrénia patogenezisében, a DRD2 és Kir2.3 gének expressziós szintjeit további analízisnek vetettük alá.

Vonatkoztatási kontrollok és alapértékek

Tizenhárom betegből és 10 kontroll, egészséges egyénből származó teljes RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk, DRD2 és Kir2.3 génekre specifikus láncindítókval és TaqMan-próbákkal összekevert cDNS-mintákon QRT-PCR-t végeztünk. Belső

referenciakontrollként β -aktint vagy hipoxantin foszforil-transzferázt (HPRT) kódoló gént alkalmaztunk. A Ct-értékek és a reakció hatékonysági értékeinek felhasználásával relatív mennyiségi analízist végeztünk, hogy meghatározzuk minden egyénben és mindkét gén esetében a gének normalizált Ct-értékei és az 5-5 nemileg azonos kontrollgyén Ct-értékei alapján számított átlagértékek közötti pontos arányt.

A DRD2 és Kir2.3 mRNS-szintek változékonyságának egészséges mintákból való meghatározására, mindkét génre relatív expressziós szintet számítottunk. A két gén relatív expressziós szintjének varianciáját a kontrollmintákban az 1. ábra mutatja. A DRD2 és Kir2.3 mRNS-ek relatív expressziós szintje az egészséges mintákban $0,39$ – $2,56$ -szoros, illetve $0,18$ – $3,54$ -szoros tartományban változott a SybrGreen-eljárással és $0,55$ – $2,42$ -szoros, illetve $0,67$ – $2,92$ -szoros tartományban változott a TaqMan-próba eljárás szerint. Figyelembe véve az egészséges mintákban a DRD2 és Kir2.3 gének relatív expressziós szintjében tapasztalt változékonyságot, relatív expressziós háttér szintet számítottunk. Csak azokat az érintett PBL-eket tekintettük pozitívnak, amelyekben a DRD2 és Kir2.3 relatív expressziós szintje magasabb volt, mint az egészséges kontrollban. A SybrGreen-eljárás alkalmazásával, a DRD2 és Kir2.3 esetében a $2,5$, illetve $3,54$ feletti arányokat tekintettük olyannak, mint ami fokozólag szabályozott génexpresszióra utal. A TaqMan-protokoll esetében a $2,42$, illetve $2,92$ feletti arányokat tekintet-

tűk ilyenek (2. ábra, fehér pontozott és fekete szaggatott vonalak).

A DRD2 gén fokozott expressziója

SybrGreen-módszer alkalmazásával – a kontrollminták relatív expresszióját alapul véve – a DRD2 gén túltermelését találtuk 6 szkizofrén férfi és 6 szkizofrén nő limfocitájában. A fokozott expresszió mértéke az 5,7-szerestől a 64,7-szeres mértékig terjedt SybrGreen-festéket alkalmazva. Egy női betegből származó PBL esetén (F5) DRD2 gén relatív expressziója a háttérszint alatt volt. Ebben az esetben a relatív génexpresszió mértéke 2,1-szeres volt. Az DRD2 gén expressziójának átlagos növekedése SybrGreen-eljárással történt kimutatása szerint $21,4 \pm 18,5$ -szeres ($p=0,0019$) volt (2. ábra, A. panel, fehér oszlopok). TaqMan-próbát alkalmazva, 6 nőből és 5 férfiból származó PBL-ekben detektáltuk a DRD2 gén túlműködését, amelynek mértéke ez esetben a 3,7-szeres értéktől a 24,1-szeres értékig terjedt. Egy férfi és egy nő beteg esetében (F5, M7) a DRD2 gén relatív expressziós szintje a számított háttérszint alatt volt (1,6-szeres, illetve 2,2-szeres). A DRD2 gén expressziójának átlagos növekedése a TaqMan-próbával analizálva $7,8 \pm 6,3$ -szeresnek ($p=0,0023$) adódott. (2. ábra, A panel, fekete oszlopok).

A Kir2.3 gén fokozott expressziója

Hat férfi és hat női szkizofrén betegből származó PBL esetében, a Kir2.3-gén expressziós szintje, az egészséges kontrollokkal összehasonlítva, szintén a háttér expressziós szint felett volt. A beteg és nem beteg mintákban mért Kir2.3 mRNS-ek aránya a SybrGreen-eljárással mérve 4–133,6-szoros tartományban változott. Az egyik nő betegből (F5) származó PBL-ben a Kir2.3 relatív expressziós szintje a háttérérték alatt volt (2,2-szeres). A Kir2.3 relatív expressziós szintjének általános növekedése a SybrGreen-eljárással $22 \pm 34,7$ -szeresnek ($p=0,0535$) adódott (2B. ábra, fehér oszlopok). Ezeket az expressziós szintekben mért változásokat kétszeresen jelzett TaqMan-próbák alkalmazásával is igazoltuk. Öt nő és 6 férfi szkizofrén betegből származó PBL-ben a Kir2.3 gén mRNS-szintje növekedett (2,8–15,8-szeresére). Két női betegből származó PBL-ben (F1, F5) a Kir2.3 relatív expressziós szintjei a számított háttérszint alatt volt (2,4-szeres, illetve 1,6-szeres). A Kir2.3-génexpresszió átlagos növekedése a TaqMan-próbával analizálva $8,2 \pm 4,8$ -szeresnek ($p=0,0001$) adódott (2B. ábra, fekete oszlopok). A két különböző valósídejű PCR-eljárásban, az expressziós szintekben a megfigyelt különbségek a TaqMan-protokoll pontosabb és érzékenyebb sajátságaival magyarázhatók.

Hasonlósági csoportok

A génexpressziós adathalmaz hasonlósági csoportjainak meghatározására agglomeratív hierarchiális klaszterezést alkalmaztunk. Az egészséges és beteg minták egyértelműen besorolhatók két különálló klaszterbe (a szkizofrén F5 páciens egyértelmű kivételével).

A férfi és női páciensekben a relatív expressziós szintek között nem találtunk szignifikáns különbségeket (3. ábra).

A betegekben származó PBL-ben differenciáltan expresszálnak talált gének közül két gén, a DRD2 és Kir2.3 expresszióját serkentőleg szabályozott voltát SybrGreen- és TaqMan-próbák alapján QRT-PCR-rel igazoltuk. Mivel sem a beteg, sem pedig az egészséges egyének nem álltak antipszichotikus vagy más gyógyszeres kezelés alatt, a DRD2 és Kir2.3 mRNS-ek megemelkedett szintjei önmagában az elváltozást tükrözik, és nem a gyógyszerelés hatását. Így a DRD2 és Kir2.3 a szkizofrénia előrejelzésére szolgáló további genetikai markerek lehetnek. A már publikált molekuláris markerek és gének, és a jelen gének kombinációjának nagy teljesítményű analízise segíti ezen elváltozás korábbi és pontosabb diagnosztizálását. Ezen eredmények alapján diagnosztikai tesztek fejleszthetők ki és segíthetik elő a szkizofrénia kézben tartását a kezdetől a krónikus stádiumig.

A találmányban alkalmazható és technikában leírt számos, a leírásban hivatkozott eljárás a kitanítás részét képezi.

Irodalomjegyzék

- McKenna F., McLaughlin P. J., Lewis B. J., Sibbring G. C., Cummers J. A., Bowen-Jones D. *et al.* Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J. Neuroimmunol* 2002; 132: 34–40.
- Ricci A., Bronzetti E., Felici L., Greco S., Amenta F. Labeling of dopamine D3 and D4 receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes with [3H]7-OH-DPAT: a combined radioligand binding assay and immunochemical study. *J. Neuroimmunol* 1998; 92: 191–5.
- Ilani T., Ben-Shachar D., Strous R. D., Mazor M., Sheinkman A., Kotler M. *et al.* A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 625–228.
- Ricci A., Bronzetti E., Felici L., Tayebati S. K., Amenta F. Dopamine D4 receptor in human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding assay study. *Neurosci Lett* 1997; 229: 130–134.
- Lewis D. A., Lieberman J. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 2000; 28:325–34.
- Abi-Dargham A., Rodenhiser J., Printz D., Zea-Ponce Y., Gil R., Kegeles L. S. *et al.* Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 8104–9.
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987; 1: 133–52.
- Ricci A., Veglio F. and Amenta F. Radioligand binding characterization of putative dopamine D3 receptor in human peripheral blood lymphocytes with

- [3H] 7-OH-DPAT. *J. Neuroimmunol.* 1995; 58: 139–144.
9. Bondy B., de Jonge S., Pander S., Primbs J., Ackenheil M. Identification of dopamine D4 receptor mRNA in circulating human lymphocytes using nested polymerase chain reaction. *J. Neuroimmunol.* 1996; 71: 139–144.
10. Bishopric N. H., Cohen H. J., Lefkowitz R. J. Beta adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1980; 65: 29–33.
11. Kwak Y. T., Koo M. S., Choi C. H., Sunwoo I. Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC Med. Genet.* 2001; 2:3.
12. Perl O., Ilani T., Strous R. D., Lapidus R., Fuchs S. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in schizophrenia: decreased mRNA levels in peripheral blood lymphocytes. *FASEB J.* 2003; 17: 1948–50.
13. Levite M., Chowers Y., Ganor Y., Besser M., HersHKovits R., Cahalon L. Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function. *Eur. J. Immunol.* 2001; 12:3504–12.
14. Barbanti P., Fabbri G., Ricci A., Bruno G., Cerbo R., Bronzetti E., Amenta F., Luigi Lenzi G. Reduced density of dopamine D2-like receptors on peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2000; 120: 65–75.
15. Mirnics K., Middleton F. A., Marquez A., Lewis D. A., Levitt P. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 2000; 28: 53–67.
16. Mirnics K., Middleton F. A., Lewis D. A., Levitt P. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 479–86.
17. Mirnics K., Middleton F. A., Stanwood G. D., Lewis D. A., Levitt P. Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2001; 6: 293–301.
18. Middleton F. A., Mirnics K., Pierri J. N., Lewis D. A., Levitt P. Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J. Neurosci.* 2002; 22: 2718–29.
19. Hakak Y., Walker J. R., Li C., Wong W. H., Davis K. L., Buxbaum J. D., Haroutunian V., Fienberg A. A. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98: 4746–51.
20. Marcotte E. R., Srivastava L. K., Quirion R. cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* 2003; 100: 63–74.
21. Balázs J., Bitter I. (Study on construct validity of the M. I. N. I. PLUS interview), *Psychiat. Hung.* 2000; 15: 134–44.
22. American Psychiatric Association. DSM-I: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.
23. Kay S. R., Fiszbein A., Opler L. A. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1987; 13: 261–76.
24. Puskas L. G., Hackler L. Jr., Kovacs G., Kupihar Z., Zvara A., Micsik T., van Hummelen P. Recovery of cyanine-dye nucleotide triphosphates. *Anal. Biochem.* 2002; 305: 279–81.
25. Onody A., Zvara A., Hackler L. J., Vigh L., Ferdinandy P., Puskas L. G. Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett.* 2003; 536: 35–40.
26. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 2001; 29: e45.
27. Albert P. R., Neve K. A., Bunzow J. R., Civelli O. Coupling of cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J. Biochem.* 1990; 265: 2098–2104.
28. Myeong H., Jeoung D., Kim H., Ha J. H., Lee Y., Kim K. H. et al. Genomic analysis and functional expression of canine dopamine D2 receptor. *Gene* 2000; 257: 99–107.
29. Cohen N. A., Sha Q., Makhina E. N., Lopatin A. N., Linder M. E., Snyder S. H., Nichols C. G. Inhibition of an inward rectifier potassium channel (Kir2.3) by G-protein betagamma subunits. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 32301–5.
30. Perier F., Radeke C. M., Vandenberg C. A. Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91:6240–4.
31. Uchida S., Akaike N., Nabekura J. Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 2000; 39: 191–201.
32. Lavine N., Ethier N., Oak J. N., Pei L., Liu F., Trieu P. et al. G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 46010–9.
33. Roberts D. A., Balderson D., Pickering-Brown S. M., Deakin J. F., Owen F. The abundance of mRNA for dopamine D2 receptor isoforms in brain tissue from controls and schizophrenics. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1994; 25: 173–175.
34. Tallerico T., Novak G., Liu I. S., Ulpian C., Seeman P. Schizophrenia: elevated mRNA for dopamine D2 (Longer) receptors in frontal cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001; 87: 160–165.
35. Vawter M. P., Ferran E., Galke B., Cooper K., Bunney W. E., Byerley W. Microarray screening of lymphocyte gene expression differences in a multiplex schizophrenia pedigree. *Schizophr. Res.* 2004; 67: 41–52.
36. Strausberg, R. L. et al, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (26), 16899–16903 (2002).

37. Araki, K., Kuwano, R., Morii, K., Hayashi, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Katagiri, T., Usui, H., Kumamishi, T. and Takahashi, Y., Structure and expression of human and rat D2 dopamine receptor genes, *Neurochem. Int.* 21 (1), 91–98 (1992).

38. Dearry, A., Falardeau, P., Shores, C. and Caron, M. G., D2 dopamine receptors in the human retina: cloning of cDNA and localization of mRNA, *Cell. Mol. Neurobiol.* 11 (5), 437–453 (1991).

39. Monsma, F. J. Jr., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Mahan, L. C. and Sibley, D. R. TITLE Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing JOURNAL Nature 342 (6252), 926–929 (1989).

40. Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. B., Bach, A., Shivers, B. D. and Seeburg, P. H., The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing, *EMBO J.* 8 (13), 4025–4034 (1989).

41. Grandy, D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., Stofko, R. E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J. B., Burke-Howie, K. J., Bunzow, J. R., Server, A. C. et al., Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (24), 9762–9766 (1989).

42. Perier, F., Radeke, C. M. and Vandenberg, C. A., Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (13), 6240–6244 (1994).

43. Tang, W. and Yang, X. C., Cloning a novel human brain inward rectifier potassium channel and its functional expression in *Xenopus* oocytes, *FEBS Lett.* 348 (3), 239–243 (1994).

44. Makhina, E. N., Kelly, A. J., Lopatin, A. N., Mercer, R. W. and Nichols, C. G., Cloning and expression of a novel human brain inward rectifier potassium channel, *J. Biol. Chem.* 269 (32), 20 468–20 474 (1994).

45. Budarf, M. L., Perier, F., Barnoski, B. L., Bell, C. J. and Vandenberg, C. A., Assignment of the human hippocampal inward rectifier potassium channel (HIR) gene to 22q13.1, *Genomics* 26 (3), 625–629 (1995).

46. Noam A. Cohen, Qun Shan, Elena N. Makhina, Anatoli N. Lopatin, Maurine E. Linder, Solomon H. Snyder and Collin, G. Nichols, Inhibition of an Inward Rectifier Potassium Channel (Kir2.3) by G-protein $\beta\gamma$ Subunits, *J. Biol. Chem.* 271 (50), 32 301–32 305 (1996).

47. Bannister JP, Young BA, Sivaprasadarao A, Wray D., Conserved extracellular cysteine residues in the inwardly rec potassium channel Kir2.3 are required for function but not expression in the membrane, *FEBS Lett.*, 24, 458 (3): 393–9, (1999).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás szkizofrénia diagnosztizálására egy adott alanyban, *azzal jellemezve*, hogy

- az alanytól vett perifériás vérből származó limfocitákban (PBL-ben) meghatározzuk az alábbi gének közül legalább egynek a génexpressziós szintjét:

DRD2-t (dopamin D2 receptor) kódoló gén és/vagy

Kir2.3-at (befeled irányító káliumcsatorna 2.3) kódoló gén; és

- 5 – a perifériás vér limfocitáiban mért expressziós szintet összehasonlítjuk a megfelelő gének expressziójának egészséges alanyokban mérhető alapszintjével,

10 ahol a PBL-ben talált magasabb génexpressziós szint jelzi, hogy az alany szkizofrénias vagy arra fogékony.

2. A 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az expressziós szint meghatározásában a biológiai mintából nyert mRNS vagy cDNS nukleinsavhibridizációs próbával történő hibridizálásával végezzük, ahol a nukleinsav szekvenciája:

DRD2-t (dopamin D2 receptor) kódoló gén és/vagy Kir2.3-at (befeled irányító káliumcsatorna 2.3) kódoló gén,

20 azok része,

vagy a fentiek bármelyikével komplementer szekvencia.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az expressziós szintet mikromátrixanalízissel, előnyösen PCR-eljárással, előnyösen valósídejű PCR-eljárással határozzuk meg.

4. Az alábbiak közül legalább egyhez specifikusan kötődni képes vegyület alkalmazása szkizofrénia diagnosztizálására személyben:

30 DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy

Kir2.3-at kódoló nukleinsav,

a személyből vett perifériás vérből származó limfocitákban (PBL-ben) a nukleinsav(ak) génexpressziós szintjének meghatározásával.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a vegyület a DRD2-t vagy Kir2.3-t kódoló nukleinsavhoz, ezek bármelyikével komplementer nukleinsavhoz vagy ezek bármelyikének részéhez specifikusan hibridizálni képes oligonukleotid, előnyös jelölést, előnyösebben fluoreszcens vagy radioaktív jelölést hordozó oligonukleotid.

6. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a vegyület PCR-ben alkalmazható oligonukleotid-láncindító.

7. Diagnosztikai készlet alkalmazása alanyban szkizofrénia diagnosztizálására az alábbi gének közül legalább egynek a génexpressziós szintje meghatározásával:

DRD2-t kódoló gén és/vagy

45 Kir2.3-at kódoló gén, amely készlet tartalmazza az alábbiakat:

legalább egy, az alábbiak közül legalább egyet megkötni képes vegyület:

DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy

Kir2.3-at kódoló nukleinsav, és

55 eszköz a vegyület specifikus kötődése esetén kimutatható jel előállítására.

8. Diagnosztikai készlet 7. igénypont szerinti alkalmazása, ahol a kimutatható jel előállítására szolgáló eszköz jelölés, előnyösen enzimés jelölés, fluoreszcens jelölés vagy radioaktív jelölés, és

előnyösen a diagnosztikai készlet a nukleinsavak közül legalább egynek amplifikálására alkalmas oligonukleotid-láncindító párt is tartalmaz.

9. Diagnosztikai készlet 8. igénypont szerinti alkalmazása, ahol a vegyület a nukleinsavak, azok komplementerei vagy részei bármelyikéhez specifikusan hibridizálni képes oligonukleotidot tartalmazó próba, és előnyösen a próba oligonukleotidot és ahhoz kötött jelölést tartalmaz.

10. Diagnosztikai készlet 8. igénypont szerinti alkalmazása, ahol a jelölés fluoreszcens jelölés és

a próba fluoreszcens jelölést vagy kioltóanyagot tartalmaz és/vagy

a próba oligonukleotid, és a jelölés kelátképző vegyület, például SybrGreen vagy etidium-bromid.

11. Oligonukleotidpróba alkalmazása alanyban szkizofréria diagnosztizálására az alábbi gének közül legalább egynek a génexpressziós szintje meghatározásával:

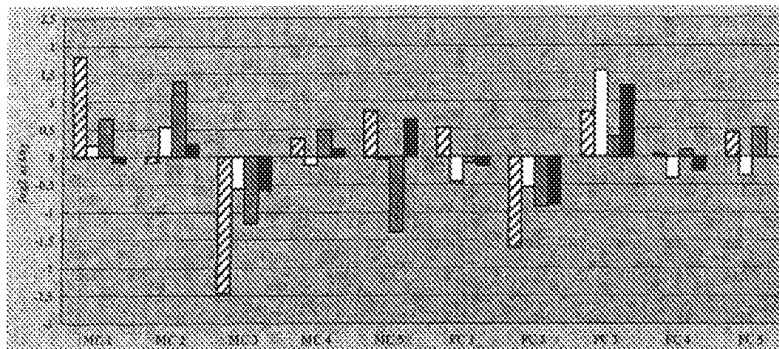
DRD2-t kódoló gén és/vagy

Kir2.3-at kódoló gén,

amely próba az alábbiakat kódoló nukleinsavak közül legalább egyhez specifikusan hibridizálódni képes: DRD2-t kódoló nukleinsav és/vagy Kir2.3-at kódoló nukleinsav,

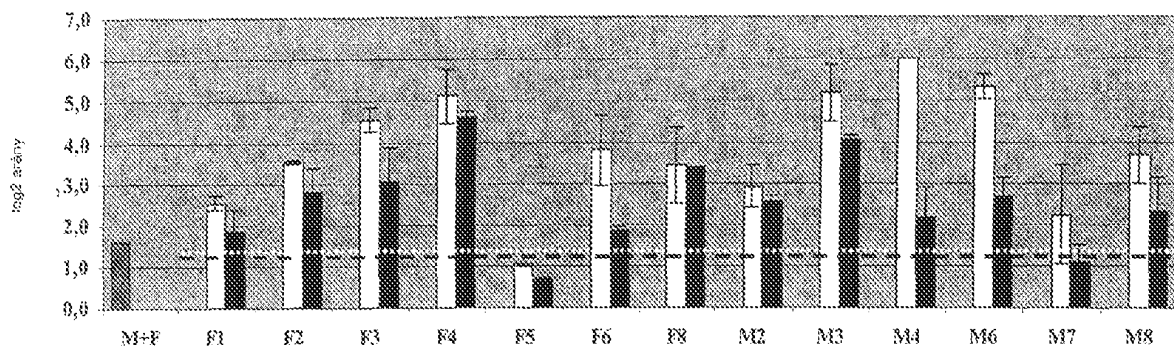
vagy azok komplementere vagy része, és

előnyösen a próba fluoreszcens jelölést tartalmaz.

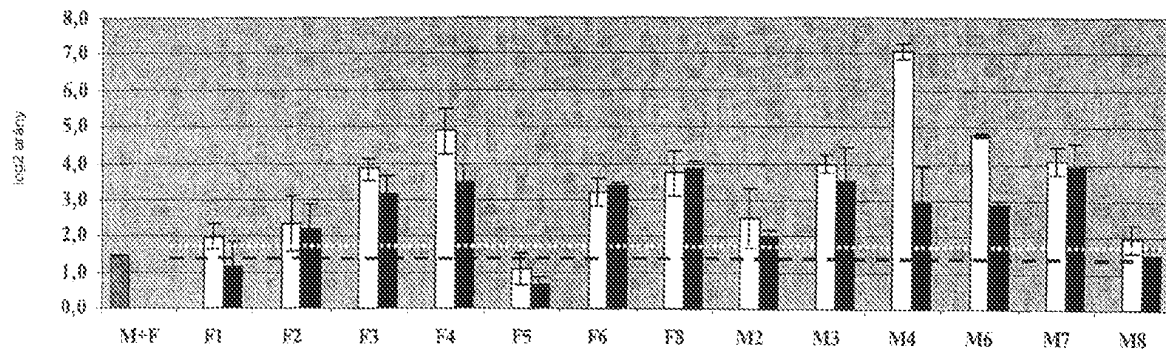


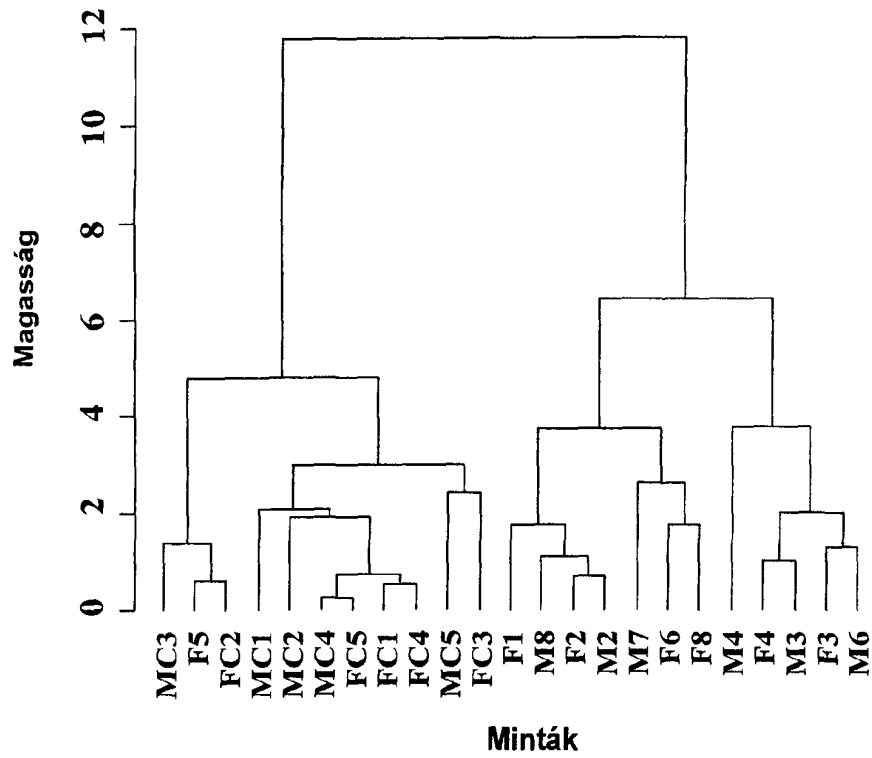
1. ábra

2A. ábra



2B. ábra





3. ábra