

POLYMORFISMUS GENU PRO OPRM1 MÁ VZTAH KE SCHIZOFRENII: NOVÝ KANDIDÁTNÍ GEN

původní práce

Omar Šerý¹, Jan Lochman¹,
Lukáš Častulík¹, Radovan Příkryl²,
František Štátný¹

¹Laboratoř neurobiologie
a molekulární psychiatrie,
Ústav biochemie Přírodovědecké
fakulty MU, Brno

²Psychiatrická klinika LF MU
a FN Brno

Kontaktní adresa:

doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
Laboratoř neurobiologie a nukleární
psychiatrie,
Ústav biochemie
Přírodovědecké fakulty MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: omarsery@sci.muni.cz

Tento projekt byl podpořen Interní
grantovou agenturou Ministerstva
zdravotnictví ČR – IGA MZ ČR
č. NR9298-3/2007 a dále projektem
Ministerstva školství, mládeže a tělo-
výchovy ČR č. MSM0021622413.

SOUHRN

Šerý O, Lochman J, Častulík L, Příkryl R, Štátný F. Polymorfismus genu pro OPRM1 má vztah ke schizofrenii: nový kandidátní gen

Abnormality v neurovývoji patří mezi nejvíce přijímané hypotézy etiologie schizofrenie. Existují důkazy, že genetické faktory mohou ovlivňovat abnormální neurovývoj u této choroby. Naše studie byla zaměřena na vztah mezi funkčním polymorfismem A118G genu pro OPRM1 a schizofrenií na skupině 227 mužů. V naší asociační studii jsme objevili statisticky významný rozdíl alelických a genotypových frekvencí mezi skupinami mužů z kontrolní skupiny a mužů schizofreniků. S přihlédnutím k současným poznatkům se domníváme, že polymorfismus genu pro OPRM1 může ovlivňovat myelinizaci neuronů v CNS prostřednictvím regulace exprese OPRM1 receptorů na povrchu oligodendrocytů. Myelinizace neuronů centrální nervové soustavy se jeví jako důležitý faktor patogeneze schizofrenie.

Klíčová slova: schizofrenie, asociační studie, polymorfismus, OPRM1, DNA.

SUMMARY

Šerý O, Lochman J, Častulík L, Příkryl R, Štátný F. The relationship between OPRM1 polymorphism and the schizophrenia: new candidate gene

An abnormality in neurodevelopment is one of the most accepted etiologic hypotheses in schizophrenia. There is strong evidence that genetic factors may influence abnormal neurodevelopment in this disease. Our study was focused on the relationship between functional A118G polymorphism of OPRM1 gene and schizophrenia on the group of 227 males. In our association study we found statistically significant difference of allelic and genotypic frequencies between control and schizophrenic males. According recent knowledge, we hypothesize that OPRM1 gene polymorphism can influence myelinization of CNS neurons through of regulation of expression of OPRM1 receptors on oligodendrocytes. The myelinization of CNS neurons seems to be one of important factor of pathogenesis of schizophrenia.

Key words: schizophrenia, association study, polymorphism, OPRM1, DNA.

ÚVOD

Studium molekulární podstaty patogeneze schizofrenie se v posledních letech setkává s úspěchem. Bylo objeveno několik genů, které se výrazně podílejí na patogenezi schizofrenie, nicméně stále nemáme v rukou příčinné

polymorfismy, které by bylo snadné použít pro predikci onemocnění nebo pro predikci odpovědi na léčbu, pro přehled Štátný et Balcar.¹⁰ Schizofrenie patří mezi multifaktoriální a zároveň polygenetické choroby. Z tohoto důvodu

nelze očekávat objevení příčinného polymorfismu, ale spíše příčinných kombinací více polymorfismů. Zásadní obrat lze očekávat v několika příštích letech, které přinesou výsledky z velkých asociačních studií na souborech tisíců osob, kdy budou využity tzv. DNA čipové technologie. Tyto postupy umožní odhalení interakcí polymorfismů, které vedou k různým příznakům schizofrenie, odliší její jednotlivé formy a pomohou také při hledání účinné léčby ať už v oblasti individuální predikce odpovědi na léčbu, nebo při hledání nových léčiv.

Schizofrenie je pokládána za neurovývojové onemocnění. Mnoho kandidátních genů, které se podařilo se schizofrenií asociovat, patří mezi regulátory vývoje CNS. Některé studie naznačují, že také opioidní systém je významným regulátorem vývoje CNS v prvním a druhém trimestru. V naší práci jsme se zaměřili na hledání vztahu mezi opioidním systémem a schizofrenií. Pro pilotní studii jsme si vybrali opioidní receptor mu a jeho funkční DNA polymorfismus A118G. Tento polymorfismus způsobuje záměnu aminokyselin asparaginu na kyselinu aspartovou, čímž se ovlivní extracelulární oblast receptoru pro glykosylaci a tím i odpověď na endogenní opioidy.¹⁰

METODIKA

Ve studii byl využit soubor 227 mužů české národnosti. Skupina schizofreniků čítala 77 mužů o průměrném věku $36,2 \pm 17,3$ roku. Nemocní byli diagnostikováni podle kritérií MKN-10 (Mezinárodní klasifikace nemocí – 10. revize). Všichni zúčastnění byli hospitalizováni na Psychiatrické klinice FN Brno.

Kontrolní skupina zahrnovala 150 mužů s průměrným věkem $43,3 \pm 8,7$ roku. U kontrolních osob bylo provedeno vyšetření pomocí M.I.N.I. – Mini mezinárodní neuro-psychiatrické vyšetření.⁶

Všechny osoby podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii, který je archivován. DNA byla izolována z periferní krve izolačním kitem UltraClean BloodSpin Kit (MoBio, USA).

Detekce polymorfismů byla provedena podle metodiky navržené v naší laboratoři. K detekci byl využit automatizovaný systém AB7300 (Applied Biosystems). Pro PCR reakci byly využity primery MU1 5' - CAC GAA CGC CAG CAA TTG -3', MU2 5' - TGA TCG TGA TGG CCG TGA T -3' a sondy SMUA (3' - Eclipse a 5' - Yakima Yellow) 5' - CA CTT AGA TGG CAA CCT GTC CGA CCC A -3' a SMUG (3' - Eclipse a 5' - FAM) 5' - CC CAC TTA GAT GGC GAC CTG TCC GA -3'. Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahovala 12,5 μ l TaqManUniversal PCR Master Mix (Applied Biosystems); 1 μ M každého z primerů; 0,125 μ M sondy SMUA; 0,075 μ M sondy SMUG; 100 ng genomové DNA. Odlišné genotypy byly detekovány pomocí navázaných sond, data byla uložena v systému počítače.

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit program CSS Statistica (StatSoft, USA). Z výsledků genotypizace byly vypracovány kontingenční tabulky. K porovnání jednotlivých genotypových frekvencí vyšetřovaných skupin byl použit χ^2 test a k porovnání alelických frekvencí byl použit Fisher's Exact Test.

VÝSLEDKY

Výsledky genotypizace polymorfismu A118G genu pro OPRM1 jsou shrnuty v tab 1.: 47 nemocných neslo genotyp AA, 24 nemocní byli heterozygoti AG a GG homozygotů bylo 6. Homozygotů AA bylo u kontrolních osob 117, heterozygotů AG bylo 31 a homozygoti GG byli 2.

Porovnáním genotypových frekvencí byl zjištěn významný statistický rozdíl mezi sledovanými skupinami ($p < 0,0056$). U osob se schizofrenií se vyskytoval genotyp GG 6krát častěji než u kontrolních osob. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn i při srovnání alelických frekvencí mezi muži se schizofrenií a muži z kontrolní skupiny ($p < 0,0022$), kdy alela G byla spojena s 2,3krát vyšším rizikem vzniku schizofrenie (OR = 2,3099; 95 % CI of OR = 1,382509 až 3,859355).

DISKUSE

Tato práce jako první přináší nalezení vztahu mezi schizofrenií a opioidním receptorem mu (OPRM1). Prozatím nebyla publikována práce, která by studovala vztah mezi schizofrenií a tímto receptorem. Jediná publikovaná japonská práce objevila signifikantní vztah mezi A118G polymorfismem genu pro OPRM1 a tardivní dyskinezi u pacientů se schizofrenií.⁷ Čínská studie vztah mezi tardivní dyskinezi a A118G polymorfismem nezjistila.¹¹

Schizofrenie je neurovývojové onemocnění. V posledních letech je stále častěji zmiňována úloha oligodendrocytů (oligodendroglíí) při vývoji mozkové kůry.⁹ Oligodendrocyty se vyvíjejí z pluripotentních neuronálních kmenových buněk. Při vývoji CNS migrují do oblastí, kde axony postrádají myelinové pochvy a opouzdřují je.¹ Myelinizace je nezbytná pro saltatorní přenos signálů na delší vzdálenosti. V mozku je myelinizace axonů důležitá pro rychlou axonální vodivost a informační toky mezi různými oblastmi mozku.

Pro správnou myelinizaci je důležité vhodné časování proliferace a diferenciac oligodendrocytů. Diferenciace oligodendrocytů je řízena např. neuregulinem a mnoha neurotransmitery. V různých fázích diferenciac obsahují oligodendrocyty na svém povrchu různé receptory. Patří sem např. opioidní receptor mu (OPRM1), dopaminové receptory D2 a D3, NMDA receptory, GABA A receptory a mnohé další. NR1 podjednotka NMDA receptoru byla

Tab. 1. Výsledky genotypizace A118G (Asn40Asp) polymorfismu genu pro OPRM1

skupina	počet osob s daným genotypem			celkem	genotypové frekvence v %			frekvence alely A	Fisher's Exact Test	χ^2 test
	AA	AG	GG		AA	AG	GG			
Schizofrenici	47	24	6	77	61,0	31,2	7,8	0,77	0,0022	0,00561
Kontroly	117	31	2	150	78,0	20,7	1,3	0,88		

objevna ve výběžcích oligodendrocytů, nikoliv na jejich těle. Časování exprese NR1 podjednotky a rozdíly v expresi NR1 podjednotky u osob se schizofrenií mohou hrát zásadní roli v patogenezi schizofrenie.¹⁰ Aktivace glutamatergických a GABAergických receptorů ovlivňuje přežívání oligodendrocytů, jejich proliferaci, migraci a zachování myelinu.³ Opioidní receptory přímo kontrolují proliferaci progenitorových buněk oligodendrocytů a růst myelinových pochev.

Zvýšená extracelulární koncentrace dopaminu typická pro schizofrenii aktivuje D3 receptory na povrchu oligodendrocytů, což vede k potlačení jejich funkce a myelinizace. Jak se ukazuje, poškození oligodendrocytů není pouze následkem zvýšených dopaminových transmisí, ale také jejich příčinou. Naopak potlačená myelinizace vede k poškození dopaminového systému. Myši se zablokovaným genem pro receptor pro neuregulin 1 (erbB4) vykazovaly opožděnou maturaci, hypomyelinizaci a pomalejší vodivost axonů v CNS.⁸ To následně vedlo k deregulovanému vylučování dopaminu v reakci na neuronální stimuly, změně exprese neuronálních dopaminových receptorů a ke změnám chování. Při otázce, co je primární, je zřejmé, že primární bude deficit v myelinizaci, který povede k poruše dopaminového systému. Tyto poznatky vedou k závěru, že myelinizace hraje klíčovou roli v řízení normálních funkcí mozku dopaminového systému.

Myelinizace prefrontálního kortexu začíná v pozdní adolescenci a končí v časně dospělosti, tedy ve věku typickém pro nástup schizofrenie. Byla zjištěna nižší hustota oligodendrocytů v mozkové kůře pacientů se schizofrenií,² včetně perineuronálních oligodendrocytů ve vrstvě IIIa, IIIb a IIIc.¹³ Nižší hustota oligodendrocytů pak znamená menší míru myelinizace kortikálních axonů pacientů se schizofrenií.

Při testování perinatálního vlivu buprenorfinu na myelinizaci u potkanů bylo zjištěno, že buprenorfin v různých dávkách buď podporuje, nebo potlačuje (vyšší dáv-

ky – 1 mg/kg/den) myelinizaci a ovlivňuje interakci mezi neurony a oligodendrocyty. Opioidní systém ovlivňuje u člověka diferenciaci neuronů a glií v prvním a druhém trimestru a tento efekt je zprostředkován opioidními receptory delta a mu.¹² Mu-opioidní receptory se vyskytují na povrchu oligodendrocytů a jejich aktivace vede k posílení syntézy DNA.⁴

Studovaný polymorfismus A118G genu pro OPRM1 ovlivňuje funkci receptoru. Alela G snižuje expresi receptoru. Ve své studii jsme zjistili vyšší frekvenci alely G a genotypu GG u pacientů se schizofrenií. Z výsledků můžeme vyvodit hypotézu, že hypoteticky nižší exprese mu receptoru u osob se schizofrenií v průběhu vývoje mozku může negativně zasáhnout do myelinizace kortikálních axonů a ovlivnit tak vznik hyperaktivity dopaminového systému typického pro schizofrenii.

ZÁVĚR

Ve své práci jsme se zaměřili na zkoumání vztahu mezi funkčním polymorfismem genu pro OPRM1 (mu receptor) a schizofrenií u mužské části české populace. Nalezli jsme doposud nepublikovaný statisticky významný vztah mezi polymorfismem A118G (Asn40Asp) genu pro OPRM1 a schizofrenií. Na základě současných poznatků o vlivu OPRM1 receptorů na vývoj CNS se domníváme, že endogenní opioidy zasahují do myelinizace neuronů prostřednictvím OPRM1 receptorů přítomných na povrchu oligodendrocytů. Naše výsledky naznačují, že studovaný polymorfismus by mohl ovlivňovat myelinizaci kortikálních neuronů v průběhu vývoje CNS prostřednictvím ovlivňování exprese OPRM1 receptoru a zasahovat tak do patogeneze schizofrenie. Získaná data bude třeba ověřit na větších souborech osob.

LITERATURA

- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008; 60: 430–440.
- Hof PR, Haroutunian V, Friedrich VL Jr, Byne W, Buitron C, Perl DP, Davis KL. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003; 53: 1075–1085.
- Káradóttir R, Attwell D. Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience* 2007; 145: 1426–1438.
- Knapp PE, Hauser KF. Mu-opioid receptor activation enhances DNA synthesis in immature oligodendrocytes. *Brain Res* 1996; 743: 341–345.
- Kroslak T, Laforge KS, Gianotti RJ, Ho A, Nielsen DA, Kreek MJ. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu opioid receptor. *J Neurochem* 2007; 103: 77–87.
- Lecrubier Y, Sheehan DV, Weiller E, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC. The MINI-international neuropsychiatric interview (M.I.N.I.): a short diagnostic structured interview: reliability and validity according to the CIDI. *Eur Psychiatry* 1997; 12: 224–231.
- Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Kojima H, Nakamura J. Polymorphisms of mu and delta opioid receptor genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2001; 52: 137–138.
- Roy K, Murtie JC, El-Khodori BE, Edgar N, Sardi SP, Hooks BM, Benoit-Marand M, Chen C, Moore H, O'Donnell P, Brunner D, Corfas G. Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8131–8136.
- Segal D, Koschnick JR, Slegers LH, Hof PR. Oligodendrocyte pathophysiology: a new view of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2007; 10: 503–511.
- Šťastný F, Balcar JV. Schizofrenie jako genetická porucha synaptického spojení. *Psychiatrie* 2008; 12 (suppl. 2): 29–38.
- Tan EC, Chong SA, Mahendran R, Tan CH, Teo YY. Mu opioid receptor gene polymorphism and neuroleptic-induced tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2003; 65: 61–63.
- Tripathi A, Khurshid N, Kumar P, Iyengar S. Expression of delta- and mu-opioid receptors in the ventricular and subventricular zones of the developing human neocortex. *Neurosci Res* 2008; 61: 257–270.
- Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res* 2007; 94: 273–280.