

Badania asocjacyjne, badania rodzin i sekwencjonowanie DNA polimorfizmu genu transportera dopaminy DAT 1 w zespole zależności alkoholowej

Case-control, family based and screening for DNA sequence variation in the dopamine transporter gene polymorphism DAT 1 in alcohol dependence

Anna Grzywacz, Jerzy Samochowiec

Katedra i Klinika Psychiatrii Pomorskiej AM w Szczecinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Samochowiec

Summary

Aim. The paper focuses on candidate gene polymorphism and on the role of dopamine transporter gene polymorphism DAT 1 in the pathogenesis of alcoholism. We investigated this polymorphism in the association study in a whole group of alcoholics (n=150), fathers (n=84) and mothers (n=101) and patients with alcohol dependence (n=103).

The control group consisted of healthy volunteers with excluded psychiatric disorders, gender and age matched (n=183). The transmission disequilibrium test (TDT) was used in the study. At the last stage of the study we screened the DNA sequence and compared 9 VNTR and 10 VNTR.

Method. The history of alcoholism was obtained using the SSAGA (Semi-Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism - Polish version). The DAT 1 polymorphism was determined using PCR. Screening for DNA sequence variation in the dopamine transporter gene polymorphism DAT 1 was determined using ABI 310.

Results. We did not find significant differences in the case-controlled study. The alleles and genotypes distribution of the investigated polymorphism did not differ significantly between the alcoholics and the controls in the case-control study. We found significant differences in allele transmission in our patient group (n=77) 10 VNTR 63% and 9 VNTR 37% (p=0.033), from mothers to proband (p=0.049) and a statistical trend to frequent 10 VNTR allele transmission from the fathers (p=0.071). Screening for DNA sequence variation in the dopamine transporter gene polymorphism DAT 1 showed the number 9 repeat in 9 VNTR as missing.

Conclusion. The results of this study suggest that DAT 1 gene polymorphism plays a role in alcohol dependence.

Słowa kluczowe: polimorfizm, gen DAT 1, alkoholizm

Key words: polymorphism, gene DAT 1, alcoholism

Wstęp

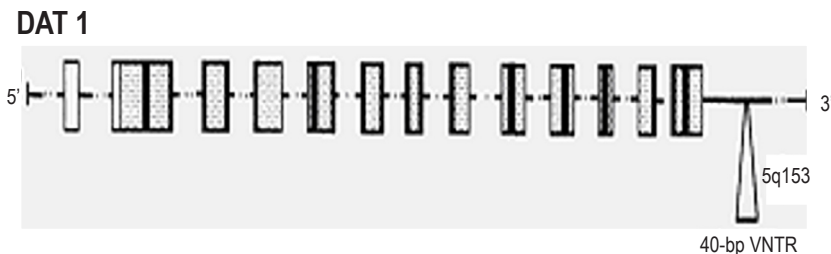
Rozpoznawanie genetycznego podłoża chorób warunkowanych złożonymi oddziaływaniami wielu genów jest skomplikowane, zwłaszcza jeśli chodzi o choroby układu nerwowego. Schorzenia te same w sobie stanowią problem zarówno diagnostyczny, jak i badawczy. Alkoholizm jako choroba uwarunkowana wieloczynnikowo nie dziedziczy się według praw Mendla, a liczba odpowiedzialnych genów, ich miejsce i ekspresja pozostają nadal nieznane [1].

Główną przyczyną wytypowania polimorfizmu genu transportera dopaminy (DAT) spośród genów kandydujących do roli markerów choroby alkoholowej ma podłoże biochemiczne [2]. DAT należy do neuronalnych błonowych transporterów Na^+ i Cl^- zależnych i jest białkiem zawierającym 620 aminokwasów [3]. Zbudowany jest z 12 domen zakotwiczonych w błonie, C- i N- końców zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo oraz długiej zewnątrzkomórkowej pętli z miejscem glikozydacji. Zarówno część zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowa mają miejsca fosforylacji, które również wpływają na funkcjonowanie transportera dopaminy [3, 4]. W małych komórkach układu autonomicznego i niektórych częściach mózgu synteza katecholamin zatrzymuje się na dopaminie i taka katecholamina jest wydzielana jako przekaźnik synaptyczny. Uwolniona dopamina działa na różne rodzaje receptorów dopaminowych, a następnie jest ponownie pozyskiwana drogą aktywnego wychwytu zwrotnego i inaktywowana przez oksydazę monoaminową i O-metylotransferazę katecholową [5].

Badania dowiodły, iż u myszy pozbawionych genu DAT dopamina w przestrzeni zewnątrzkomórkowej utrzymuje się 300 razy dłużej niż u osobników mających ten gen. Zwierzęta te cechują się zwiększoną spontaniczną aktywnością ruchową, która powoduje zwiększony poziom dopaminy w synapsie [6]. (Ze względu na to, że 90% genomu małych ssaków, jak myszy lub szczury, jest zgodne z genomem człowieka, genetyczna determinacja analogicznych zachowań ludzkich jest również podobna, natomiast czynniki środowiskowe mają różne znaczenie dla ludzi oraz innych ssaków).

Budowa genu DAT

Gen kodujący transporter dopaminy umiejscowiony jest w chromosomie 5p15.3 i zbudowany jest z 15 egzonów – ostatni z nich koduje 7 aminokwasów a pozostała część to rejon nietranslacyjny [3, 4, 7, 8, 9, 10].



Rys. 1. Schemat genu DAT 1

Poddany analizie polimorfizm polega na zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych (VNTR) w 3' UTR (w rejonie 3' nie podlegającym translacji). Pojedynczy motyw ma długość 40 par zasad (wyjątek stanowi powtórzenie 7 mające 44 pz) i wśród rasy kaukaskiej powtarza się od 3 do 11 razy. Najczęstszym allelem jest 9 powtórzeń lub 10 powtórzeń VNTR [3, 11, 12, 13]. Ponadto w 1999 roku Ueno i wsp. [14] opisali polimorfizm 3' UTR genu transportera dopaminy, który polega na zastąpieniu w pozycji 2319 guaniny adeniną. Wykazano również asocjację genotypową pomiędzy tym polimorfizmem i alkoholizmem [15].

Material i metody

Przebadano grupę 40 nie spokrewnionych osób losowo wybranych spośród populacji, rekrutowanych przez Klinikę Psychiatrii PAM w Szczecinie oraz Instytut Genetyki Człowieka Szpitala w Hamburgu (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Analizie poddano 20 osób mających allele 9/9 VNTR genu DAT oraz 20 osób mających allele 10/10 VNTR tegoż genu. DNA homozygot poddano sekwencjonowaniu. Analiza miała na celu odnalezienie ewentualnych powtarzalnych mutacji punktowych oraz określenie różnic w sekwencji zasad pomiędzy homozygotami 9/9 i 10/10.

Ponadto przeprowadzono badanie grupy osób uzależnionych od alkoholu z zamiarem ustalenia częstości występowania poszczególnych alleli – w całej grupie alkoholików (n = 150), ich ojców (n = 84), matek (n = 101) i pacjentów z ZZA (n = 183).

DNA został wyizolowany z limfocytów krwi metodą wysalania. Zastosowano technikę PCR-VNTR do analizy polimorfizmu genu DAT. Amplifikacji poddano nie ulegający translacji rejon 3' UTR genu DAT. Uzyskane produkty różniły się wielkością w zależności od liczby powtórzeń VNTR charakterystycznych dla każdego z alleli o wielkości: 440 pz (9 powtórzeń), 480 pz (10 powtórzeń) i 520 pz (11 powtórzeń). Objętość pojedynczej reakcji PCR wynosiła 25 μ l i zawierała: 100 ng genomowego DNA po 10 pmol primera, 50 mM KCl, 10 mM TrisHCl, 1,5 mM MgCl₂, 200m m dATP, dCTP, dTTP, dGTP i 0,8 jednostki *Tag* polimerazy. PCR TERMOCYKLER wykonał następujący program: 3 minuty początkowej denaturacji przy 94°C (30 sek. fazy denaturacji przy 94°C, 1 minuta hybrydyzacji przy 63°C, 1 minuta fazy syntezy przy 72°C) powtórzone w 30 cyklach, 5 minut końcowej elongacji przy temp. 72°C. Produkt reakcji PCR naniesiono na 3% żel agarozowy z bromkiem etydy. Na podstawie wyników rozdziału elektroforetycznego w obecności markerów mas DNA określono genotypy.

Sekwencjonowanie homozygot przeprowadzono wg następujących punktów:

- Reakcja oczyszczania. Mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki: 1 vol. NH₄Ac, 6 vol. alkoholu abs.; 1 vol. produktu PCR wirowano 20 min/4000 obr., następnie płukano w 200 μ l alkoholu 70%, worteksowano i wirowano 15 min/4000 obr., poddano suszeniu w temp. 37°C i dodano 50 μ l wody. Naniesiono na 3% żel agarozowy z obecnym bromkiem etydy w celu potwierdzenia obecności produktu.
- Reakcja terminacji. Mieszanina reakcyjna wynosiła 10 μ l puryfikowanego produktu. PCR TERMOCYKLER wykonał 25 cykli.

- Produkt poddano końcowemu oczyszczaniu: 5 μ l 3 M NaAc, 125 μ l alkoholu abs. worteksowano, wirowano 20 min/14 tys. obr. Płukano 70% alkoholem, worteksowano, wirowano 3 min/14 tys. obr., a następnie suszono 5 minut w 37°C. Tak przygotowany produkt naniesiono na żel poliakrylamidowy i odczytano kolejność sekwencji.

Uzyskany wynik analizowano w odniesieniu do wzorcowej sekwencji wybranego fragmentu DNA.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono, używając programu statystycznego SPSS. Do obliczenia różnic częstości występowania alleli użyto testu χ^2 .

Wyniki

Tabela 1. Frekwencje alleli i genotypów [%] polimorfizmu genu DAT 1, wartości testu χ^2 dla alleli i genotypów oraz odpowiednie wartości p, wartości ryzyka względnego (RW) dla alleli, wyniki prawa Hardy'ego–Weinberga (HWE)

Podgrupy alkoholików	Allele		Chi ² p	Genotyp			Chi ² p	RW HWE	
	10	9		10/10	10/9	9/9			
	VNTR								
Probandi z ZZA n = 103	168 [82]	38 [18]	0,937 0,333	68 [66]	32 [31]	3 [3]	1,444 0,486	1,237	0,741
Ojcowie n = 84	131 [78]	37 [22]	0,002 0,966	50 [59]	31 [37]	3 [4]	1,194 0,550	0,990	0,495
Matki n = 101	158 [78]	44 [22]	0,0004 0,983	61 [60]	36 [36]	4 [4]	0,863 0,650	1,005	0,644
Wszyscy alkoholicy n = 150	239 [80]	61 [20]	0,230 0,632	94 [63]	51 [34]	5 [3]	1,366 0,505	1,096	0,545
Grupa kontrolna n = 183	286 [78]	80 [22]	-	114 [62]	58 [32]	11 [6]	-	-	0,328

Podano frekwencje alleli i genotypów w grupie kontrolnej, grupie probantów, grupie ojców i matek probantów oraz w grupie wszystkich osób uzależnionych od alkoholu (probandi i ich rodzice).

Na podstawie uzyskanych wyników analiz nie stwierdzono występowania istotnych statystycznie zmian dystrybucji alleli i genotypów.

Wyniki testu TDT dla genu warunkującego syntezę transportera dopaminy DAT 1 (SLC6A3)

Stwierdzono częstsze przekazywanie allela 10 VNTR od rodziców do probantów ($p = 0,033$), od matek do probantów ($p = 0,049$) oraz trend do częstszego przekazywania allela 10 VNTR od uzależnionych od alkoholu rodziców do probantów ($p = 0,071$).

Tabela 2. TDT. Dystrybucja genotypów oraz frekwencje allele 9 VNTR i nośnika 9 u probantów, ich rodzin i w grupie kontrolnej dla genu DAT 1

DAT 1	n	10/10 [%]	10/9 [%]	9/9 [%]	f(10) [%]	f(9) [%]	p	TDT t(10)/t(9)	Chi ²
Indeks u probantów	77	53 [69]	23 [30]	1 [1]	25 [16]	24 [31]	0,033	36/20 63%/37%	4,571
Ojcowie probantów	77	44 [57]	31 [40]	2 [3]	35 [23]	33 [43]	0,178	17/10 63%/37%	1,815
Matki probantów	77	49 [64]	25 [33]	3 [3]	31 [20]	28 [36]	0,049	15/6 71%/29%	3,857
Uzależnieni rodzice	39	22 [56]	16 [41]	1 [3]	18 [10]	17 [44]	0,071	11/4 73%/27%	3,267
Grupa kontrolna	183	114 [62]	58 [32]	11 [6]	80 [22]	69 [38]	-	-	-

n – liczebność badanej grupy; f(10) – frekwencja allele 9 VNTR; f(9) – frekwencja nośnika allele 9 VNTR; t/t – transmisja alleli

Analiza molekularna

```

AGGAGCGTGTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
      10      20      30      40
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGC[A]TGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAG[A]AC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  [T]GGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC [C]GGAC [C]GGAC GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC [T] - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
    
```

Rys. 2. Kolejność sekwencji nukleotydowych u homozygot 9/9

```

AGGAGCGTGTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
      10      20      30      40
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGC[A]TGTCTCTATCCCTGGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAG[A]AC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  [T]GGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTCTCTATCCCTGGGAC [C]GGAC [C]GGAC GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC [T] - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
1  AGGAGCGTGTACTACTACCCAGGAC - - - - GCATGCAGGGGCCCCAC
    
```

Rys. 3. Kolejność sekwencji nukleotydowych u homozygot 10/10

Wnioski

W piśmiennictwie jest wiele prac poświęconych związkom polimorfizmu genu DAT 1 z zaburzeniami psychicznymi, wynikającymi ze zmian translacyjnych i różnym jakościowo białkiem.

Heinz i wsp. [16] stwierdzili w swoich badaniach, że osobnicy heterozygotyczni 9/10 VNTR DAT I mają średnio o 22% zredukowaną dostępność białka DAT I w prążkowie w stosunku do osobników homozygotycznych 10/10 VNTR. Z tego wynika, że polimorfizm VNTR genu DAT ma wpływ na translację białka.

Allel 10 VNTR związany jest z zespołem deficytu uwagi (ADHD), co potwierdzono w trzech niezależnych rodzinnych badaniach asocjacyjnych [3, 9, 12]. Allel 9 genu transportera dopaminy jest według Schmidta i wsp. [17] związany z cięższymi powikłaniami odstawienia alkoholu, być może z powodu kompensacji długotrwałych efektów wpływu alkoholu etylowego na funkcje mózgu.

Chen i wsp. [18], badając grupę Chińczyków i 4 grupy tubylców z Tajwanu, nie potwierdzili związku pomiędzy polimorfizmem VNTR genu DAT a alkoholizmem. Brak asocjacji wynikać tu może z 2 badania różnych populacji.

Jak wynika z przedstawionych danych z piśmiennictwa, doniesienia są sprzeczne i wymagają z całą pewnością dalszych badań w większych populacjach. Zmienna częstość występowania allela A9, od 4,2–6,2% w grupie kontrolnej Japończyków do 16–28% w grupie kontrolnej amerykańskiej, wskazuje na znaczenie kliniczne wpływu różnej częstości występowania alleli w populacjach. Obiektywizacja i powtarzalność danych wymagają więc badań licznych i homogennych etnicznie grup.

Ueno i wsp. [14] zidentyfikowali nowy polimorfizm SNP w końcu 3-UTR genu DAT 1. Występowanie allela A 2319 tego polimorfizmu stwierdzono jedynie u osobników mających allel 10-, 11-, 14-VNTR i wykazano jego związek z alkoholizmem. Haplotyp A 2319 i 10 VNTR DAT I związany jest z alkoholizmem, w przeciwieństwie do haplotypu G 2319 i 10 VNTR DAT 1.

Wernicke i wsp. [15], badając 351 niemieckich alkoholików, nie stwierdzili różnic w częstościach polimorfizmu G2319A w całej badanej grupie i w wydzielonych podgrupach. W przeciwieństwie do Ueno stwierdzili, że allel A 2319 polimorfizmu SNP występuje również u osób z allelem 9 VNTR, jednakże znacznie częściej związany jest on z allelem 10 VNTR. W prowadzonych przez nas badaniach zachowane było prawo Hardy'ego-Weinberga w grupie kontrolnej i w całej grupie probantów.

Istotne wydają się wyniki oceny rodzinnego przekazywania alkoholizmu. W odniesieniu do probantów z naszej grupy, w teście TDT stwierdzono częstsze przekazywanie allela A10 od rodziców do probantów z ZZA (36 A10 do 20 A9; $p = 0,033$), częstsze przekazywanie allela A10 od matek do probantów z ZZA (15 A10 do 6 A9; $p = 0,049$) oraz trend do częstszego przekazywania allela A10 od rodziców uzależnionych od alkoholu do probantów z ZZA (11 A10 do 4 A9; $p = 0,071$). Wynik ten sugeruje zwiększone rodzinne przekazywanie allela 10 VNTR genu DAT I do potomstwa z ZZA.

W teście TDT stwierdziliśmy przewagę przekazywania allela A10 od obojga rodziców, matek i tendencję do jego częstszego przekazywania od ojców. Zjawisko to tłumaczyć możemy związkiem allela 10 VNTR z wystąpieniem specyficznej podatności na uzależnienia.

Hauser i wsp. [19] również wykazali współwystępowanie genotypu A10/A10 u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową typu I ze współwystępującym uzależnieniem od alkoholu. Wyniki tych badań należy jednak interpretować ostrożnie, gdyż może to być związane z efektem stratyfikacji badanej populacji [20]. I w tym właśnie miejscu zasadne okazało się dogłębne poznanie molekularnej istoty alleli zawierających zarówno 10, jak i 9 powtórzeń VNTR.

Badanie dotyczące sekwencjonowania homozygot 9/9 i 10/10 było prowadzone tak, aby poznać sekwencje nukleotydomowe kolejnych powtórzeń, zweryfikować uzyskane dane z piśmiennictwa, odpowiedzieć na pytanie, którego powtórzenia brakuje w przypadku 9 powtórzeń, i ocenić różnicę pomiędzy nimi. Celowa była również ocena ewentualnych mutacji punktowych. Uzyskane wyniki dowiodły braku zmian pojedynczych nukleotydów odnośnie do wzorcowej sekwencji genu DAT 1 VNTR.

Zasadnicze różnice pomiędzy homozygotami 9/9 a 10/10:

W przypadku homozygot 9/9 w powtórzeniu 6 występuje T, natomiast u homozygot 10/10 w tym samym miejscu występuje C. Jest to SNP (*single nucleotide polymorphism*) w pozycji 784 (T/C) potwierdzony przez Millera i Madrasa [4]. Poza tym nie stwierdzono innych zmian nukleotydomowych, które mogłyby świadczyć o nowym, nieznanym do tej pory SNP w badanym fragmencie genu.

W prowadzonych badaniach dowiedziono, iż u homozygot 9/9 brakuje powtórzenia dziewiątego. Miller i Madras [4] wykazali brak fragmentu powtórzenia siódmego i ósmego. Przedstawiona analiza sekwencjonowania jest podstawą do dalszego badania, w którym zasadne będzie określenie, czy i jak allel 9/9 i 10/10 genu DAT 1 wpływa na ekspresję białka w komórce. Będzie to niewątpliwie kolejnym krokiem do pełnego poznania funkcjonalności genu DAT 1 VNTR.

Badania finansowane z grantu: KBN/ BMBF POL 01/063

Ассоциативные исследования, исследования семей и секвенирование РНК полиморфизма гена транспортера допамина DAT 1 при синдроме алкогольной зависимости

Содержание

Задание. В работе показан полиморфизм гена рецептора допамина DAT 1 и его роли в патогенезе алкоголизма. Проведен анализ этого полиморфизма как при ассоциативном исследовании во всей группе алкоголиков (150 человек) и их отцов (84 человека) матерей (101 женщина) и пациентов с алкогольной зависимостью (183 человека). Проведен также анализ теста неравновесия трансмиссии аллели (ДАТ). Контрольная группа состояла из 183 здоровых добровольцев, подобранных по полу и возрасту экспериментальной группы. В последнем периоде исследования секвенирована РНК для сравнения 9 и 413 tandemных повторений.

Метод. Данные о алкогольной зависимости собраны при помощи структурного глоссария – польская версия SSAGA (Semi Structured Assessment for the Genetic of Alcoholism).

Полиморфизм DAT 1 был оценен методом РСВ. Секвенирование проведено при использовании АВ1 310.

Результаты. Не получено статистически существенных результатов при ассоциативном исследовании. Дистрибуция исследованных аллелей и генотипов не отличалась статистически значимым образом в обеих группах. Однако, найдены статистически существенные данные о

неравнозначном передовании аллелей (ТДТ) во всей группе пациентов (77 человек) 10VNTR был передан в 63% случаев 9 VNTR передан в 37% случаев ($p = 0,033$). От матерей пробантов (77 человек – $p = 0,049$), а также статистический тренд до передачи 10VNTR от отцов ($p = 0,071$). Секвенционирование РНК показало, что в случае 9 VNTR отсутствует повторения 9.

Выводы. Полученные результаты исследований указывают на факт, что ген DAT 1, по-видимому, влияет на патогенез алкоголизма.

Assoziative Studie, Familienstudie und DNA - Sequenzierung vom Polymorphismus im DAT1 Dopamin - Transporter - Gen im Syndrom der Alkoholabhängigkeit

Zusammenfassung

Ziel. Die Arbeit zeigt den Polymorphismus im Gen des Dopaminrezeptors DAT1 und seine Rolle in der Pathogenese von Alkoholismus. Dieser Polymorphismus wurde sowohl in der assoziativen Studie in der ganzen Gruppe der Alkoholiker ($n=150$), ihrer Väter ($n=84$), ihrer Mütter ($n=101$) und der Patienten mit Alkoholabhängigkeitssyndrom ($n=183$) analysiert. Es wurde auch die Analyse des Tests auf Ungleichheit der Alleltransmission (TDT) durchgeführt. Die Kontrollgruppe bildeten 183 gesunde Probanden, die an die untersuchte Gruppe wegen Ähnlichkeit im Hinblick auf das Alter und Geschlecht eingeschlossen wurden. Bei der letzten Studienetappe wurde die DNA sequenziert, um 9 und 10 Tandemwiederholungen zu vergleichen.

Methode Die Angaben zur Abhängigkeit wurden mit Hilfe eines strukturisierten Fragebogens gefasst - polnische Version von SIGA (Strukturiertes Interview zur Genese von Alkoholismus). Der DAT1 - Polymorphismus wurde mit der Polymerasenkettenreaktion (PCR) beurteilt. Das Sequenzieren wurde mit Hilfe von ABI 310 durchgeführt.

Ergebnisse. Es wurden in der assoziativen Studie keine statistischen Differenzen erreicht. Die Verteilung der untersuchten Allelen und Genotype unterschied sich statistisch nicht signifikant in der untersuchten Gruppe und in der Kontrollgruppe. Es wurde aber eine statistische Differenz in der ungleichen Alleltransmission (TDT) in der ganzen Gruppe der Patienten ($n=77$) gefunden, 10 VNTR wurde in 63% der Fälle, 9 VNTR in 37% der Fälle ($p=0,033$) transmittiert; von den Müttern der Probanden ($n=77$), ($p=0,049$) und der statistische Trend zur Transmission von 10 VNTR von Vätern ($p=0,071$). Das DNA - Sequenzieren zeigte, dass im Falle von 9 VNTR die Wiederholung von 9 fehlt.

Schlussfolgerungen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der DAT1 Gen wahrscheinlich auf die Pathogenese von Alkoholismus einen Einfluss hat.

L'analyse associative des familles et de la séquence de DNA du polymorphisme du gène transporteur de dopamine DAT1 des patients alcooliques

Résumé

Objectif. Ce travail présente le polymorphisme du gène du récepteur de dopamine DAT1 et son rôle dans la pathogénie de l'alcoolisme. On examine ce polymorphisme dans l'analyse associative des alcooliques ($n=150$), de leurs pères ($n=84$), de leurs mères ($n=10$) et des patients avec la dépendance de l'alcool ($n=103$). Le groupe de contrôle ($n=183$) est formé des sains volontaires choisis d'après les critères de l'âge et du sexe. On analyse encore le teste de déséquilibre de la transmission des allèles (TDT) et enfin la séquence de DNA pour comparer 9 VNTR et 10 VNTR.

Méthode. L'histoire de l'alcoolisme est décrite à l'aide de la version polonaise du questionnaire SSAGA (Semi-Structured Assessment for the Genetics of Alcoholism). Le polymorphisme DAT1 est déterminé par la méthode PCR. L'analyse de la séquence de DNA est déterminée avec ABI 310.

Résultats. On ne note pas de différences significantes dans l'analyse associative. La distribution des allèles et des génotypes est presque la même chez les alcooliques et chez les personnes du groupe de contrôle. On note seulement la différence significative de la transmission des allèles (TDT) dans le groupe de patients ($n=77$), 10VNTR est transmis dans le 63% de cas, 9VNTR – 37% ($p=0,033$);

dans le groupe de mères (n=77) (p=0,049) et la tendance statistique de transmission de 10VNTR de pères (p=0,071). La séquence de DNA démontre qu'il manque de la répétition 9 de 9VNTR.

Conclusion. Ces résultats suggèrent que le gène DAT1 influe probablement sur la pathogénie de l'alcoolisme.

Piśmiennictwo

1. Devor EJ, Cloninger CR. *Genetics of alcoholism*. Ann. Rev. Genet. 1989; 23: 19–36.
2. Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ. *Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene*. Brain Res. Mol. Brain Res. 1999; 10, 74: 167–169.
3. Grunhage F, Schulze TG, Muller DJ, Lanczik M, Franzek E, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Knapp M, Cichon S, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. *Systematic screening for DNA sequence variation in the coding region of the human dopamine transporter gene (DAT 1)*. Mol. Psychiatry 2000; 5: 275–282.
4. Miller GM, Madras BK. *Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression*. Mol. Psychiatry 2002; 7: 44–55.
5. Harper M. *Biochemia*. Warszawa: PZWL; 1990.
6. Vandenberg DJ, Thompson MD, Cook EH, Bendahhou E, Nguyen T, Krasowski MD, Zarrabian D, Comings D, Sellers EM, Tyndale RF, George SR, O'Dowd BF, Uhl GR. *Human dopamine transporter gene: coding region conservation among normal, Tourette's disorder, alcohol dependence and attention-deficit hyperactivity disorder populations*. Mol. Psychiatry 2000; 5: 283–292.
7. Haeussler J, Haeusler J, Striebel AM, Assum G, Vogel W, Furneaux H, Krone W. *Tumor antigen HuR binds specifically to one of five protein-binding segments in the 3'-untranslated region of the neurofibromin messenger RNA*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 2000; 27, 267: 726–732.
8. 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: 975–979.
9. Morino H, Kawarai T, Izumi Y, Kazuta T, Oda M, Komure O, Udaka F, Kameyama M, Nakamura S, Kawakami H. *A single nucleotide polymorphism of dopamine transporter gene is associated with Parkinson's disease*. Ann. Neurol. 2000; 47: 528–531.
10. Sander T, Harms H, Podschus J, Finckh U, Nickel B, Rolfs A, Rommelspacher H, Schmidt LG. *Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium*. Biol. Psychiatry 1997; 41: 299–304.
11. Miller GM, De La Garza R 2nd, Novak MA, Madras BK. *Single nucleotide polymorphisms distinguish multiple dopamine transporter alleles in primates: implications for association with attention deficit hyperactivity disorder and other neuropsychiatric disorders*. Mol. Psychiatry 2001; 6: 50–58.
12. Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stöber G. *The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample*. Neurosc. Lett. 2001; 297: 125–128.
13. Segman RH, Cooper-Kazaz R, Macciardi F, Goltser T, Halfon Y, Dobroborski T, Shalev AY. *Association between the dopamine transporter gene and posttraumatic stress disorder*. Mol. Psychiatry 2002; 7: 903–907.
14. Ueno S, Nakamura M, Mikami M, Kondoh K, Ishiguro H, Arinami T, Komiyama T, Mitsushio H, Sano A, Tanabe H. *Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism*. Mol. Psychiatry 1999; 4: 552–557.

15. Wernicke C, Samochowiec J, Schmidt LG, Winterer G, Smolka M, Kucharska-Mazur J, Horodnicki J, Gallinat J, Rommelspacher H. *Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits*. Biol. Psychiatry 2003; 54: 922–928.
16. Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnoila M, Weinberger DR. *Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum*. Neuropsychopharmacol. 2000; 22: 133–139.
17. Schmidt LG, Harms H, Kuhn S, Rommelspacher H, Sander T. *Modification of alcohol withdrawal by the A9 allele of the dopamine transporter gene*. Am. J. Psychiatry 1998; 155: 474–478.
18. Chen WJ, Chen CH, Huang J, Hsu YP, Seow SV, Chen CC, Cheng AT. *Genetic polymorphisms of the promoter region of dopamine D2 receptor and dopamine transporter genes and alcoholism among four aboriginal groups and Han Chinese in Taiwan*. Psychiatr. Genet. 2001; 11: 187–195.
19. Hauser J, Szczepankiewicz A, Dymitrzak-Węglarz M, Skibińska M, Słopeń A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Czernski P. *Badanie polimorfizmu genu DAT w zaburzeniach dwubiegunowych z współwystępującym uzależnieniem od alkoholu*. Alkohol. Narkom. 2007; 20: 167–178.
20. Samochowiec J, Kucharska-Mazur J, Grzywacz A, Jabłoński M, Rommelspacher H, Samochowiec A, Szabowicz M, Horodnicki J, Sagan L, Pełka-Wysiecka J. *Family-based and case control study of DRD2, DAT, 5HTT, COMT genes polymorphisms in alcohol dependence*. Neurosc. Lett. 2006; 410: 1–5.

Adres: Anna Grzywacz
Katedra i Klinika Psychiatrii PAM
71-460 Szczecin, ul. Broniewskiego 26

Otrzymano: 20.08.2007
Zrecenzowano: 5.10.2007
Przyjęto do druku: 10.01.2008