

22q11.2 deléciók azonosítási kísérlete magyar szkizofrénia biobank mintákon multiplex ligációs alapú próba amplifikáció (MLPA) módszerrel: irodalmi összefoglalás, módszertani leírás és eredmények

KLEIN IZABELLA¹, SZŐCS KATALIN², VINCZE KATALIN², BENKOVITS JUDIT², SOMOGYI SZILVIA², HERMÁN LEVENTE² ÉS RÉTHELYI JÁNOS^{1,2}

¹ Nemzeti Agykutatási Program, MTA-SE NAP-B Molekuláris Pszichiátriai és in vitro betegségmodellezési Kutatócsoport, Budapest

² Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, Budapest

A szkizofrénia jelentős, krónikus lefolyást mutató pszichiátriai betegség, amelyet heterogén klinikai tünetek – hallucinációk, téveszmék, érzelmi elsivárosodás, szociális izoláció és dezorganizált viselkedés – jellemeznek, élettartam prevalenciája világszerte 0,5–1,2%. Jelenlegi tudásunk szerint a betegség etiológiájában fontos a genetikai háttér, amire a magas heritabilitás utal, ám többféle típusú genetikai variabilitásnak is jelentősége lehet az állapot kialakulásában. Az elmúlt évek kutatásai nyomán több ismerettel rendelkezünk a szkizofrénia genetikájáról, de az eredményeket egyelőre nem lehet egységes oksági modellbe rendezni. A gyakori variánsok, az egynukleotidos polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism, SNP) mellett a szkizofrénia genetikai háttérében fontos szerepet játszanak a ritka variánsok, elsősorban a gén kópiaszám változatosság (copy number variation, CNV). Ezek 1-2 Mb méretű mikrodéléciók vagy mikroduplicációk. Előfordulásuk a páciensek körében 1% alatti, de esélyhányadosuk rendkívül magas, 5-20 közötti. A leggyakoribb szkizofréniahoz köthető strukturális variáns a 22q11.2 deléció. Korábbi vizsgálatok alapján ez a szkizofrén betegek 1%-ában fordul elő, ugyanakkor a 22q11.2 deléció hordozóinak egynegyede lesz szkizofrén. A többi CNV-hez hasonlóan ennek a deléciónak is pleiotropikus a hatása, változatos fejlődési rendellenességekkel és neuropszichiátriai fenotípusokkal, hiperaktivitással, autizmussal, szubnormális intellektussal, vagy szkizofréniaival járhat. Az eltérő szomatikus megjelenési formákat korábban különböző szindrómákként írták le (DiGeorge-, velokardiofaciális (VCFS), Shprintzen-, Sedlackova-, conotruncal anomaly face-szindróma), azonban ezeknek ugyanaz a genetikai variáns az alapja. Jelenleg 22q11 deléciós szindrómaként (22Q11DS) ismert az állapot. Cikkünkben felvázoljuk ennek háttérét, irodalmát. A 22q11 delécióval rendelkező és nem rendelkező szkizofrén páciensek jelenleg nem különíthetők el egyértelműen fenotípusosan. De ez a jövőben változhat, a közelmúltban megjelentek tanulmányok a korai kezdetű Parkinson-kór gyakoribb előfordulásáról 22q11DS-ben, vagy a klopapinterápia eltérő farmakológiai hatásáról ebben a csoportban. Jelen vizsgálatunkban a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika biobankjában szereplő, szkizofréniaival diagnosztizált páciensek DNS mintáit vizsgáljuk a 22q11.2 deléció szempontjából. A vizsgálatához multiplex ligációs alapú próba amplifikációt (MLPA) használunk, amely egy polimeráz láncreakció (PCR) alapú technológia. Ennek előnye az alternatív fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatokkal szemben, hogy gyorsabb, olcsóbb, egyszerre sok minta vizsgálható és DNS mintán is elvégezhető, nem szükséges sejtes vizsgálat. Távolilag felmerül a módszer klinikai szűrésben való alkalmazhatóságának kérdése.

(Neuropsychopharmacol Hung 2016; 18(4): 209–218)

Kulcsszavak: szkizofrénia, kópiaszám változatosság, CNV, 22q11.2 deléció, 22Q11DS, multiplex ligációs alapú próba amplifikáció, MLPA

A szkizofrénia súlyos, krónikus lefolyású, általában késő serdülőkorban vagy fiatal felnőttkorban induló pszichiátriai betegség, melyre többféle heterogén magatartási tünet jellemző (hallucinációk, téveszmék, dezorganizált magatartás, érzelmi elsívárosodás, szociális izoláció). Annak ellenére, hogy több évtizedes intenzív kutatást tudhatunk magunk mögött a szkizofrénia vonatkozásában, a betegség patogeneze, neurobiológiai háttere nem ismert teljes mértékben. Tekintve, hogy a betegség heritabilitása, örökletessége magas – 0,8 vagy 80% –, konkordanciája monoizigóta ikrekben magas, míg dizigóta ikrekben alacsony (Sullivan et al., 2003), az utóbbi évtizedekben előtérbe került a szkizofrénia genetikai alapjainak kutatása.

A magas heritabilitásban a gyakori, kis penetranciájú variánsok, az egynukleotidos polimorfizmusok (SNP-k) mellett a ritka variánsok, elsősorban a gén kópiaszám változatosság (copy number variation, CNV) játszanak szerepet. A leggyakoribb szkizofréniahoz köthető CNV, amely korábbi kutatások szerint a szkizofrénia betegek 1%-ban fordul elő, a 22q11.2 hemizigóta deléció (Karayiorgou et al., 1995). Ugyanez a genetikai háttér a 22q11.2 deléció szindrómában (22Q11.2DS, MIM #188400/#192430, velokardiofaciális (VCFS) szindróma, DiGeorge-szindróma), amely általában gyermekgyógyászati, klinikai genetikai diagnózis. A 22q11.2 deléciós szindróma a leggyakoribb emberi mikrodeléciós szindróma, melynek becsült gyakorisága 4000 élve születésből egy (Goodship et al., 1998; Bassett et al., 2011).

Az eltérések több szervrendszert érinthetnek. Inkomplett penetranciával széles körű fejlődési rendellenességekkel jár, mint veleszületett szívfejlődési és palatális rendellenességek, kraniofaciális (elongált arc, hipertelorizmus), immunológiai (thymus-hipoplázia), endokrinológiai eltérések (hipoparatiroidizmus, hipokalcémia), különböző fokú értelmi fogyatékoság és gyermekkori magatartászavarok (Bassett et al., 2005; Fung et al., 2015). Fejlődési késedelem és a később kialakuló, idegrendszert érintő betegségek gyakoriak (Hiroi et al., 2013). Az ismert 22Q11.2DS-betegek 25%-ában alakul ki szkizofrénia, de a genetikai szindrómában megnő az autizmus, az ADHD, a szorongásos zavarok, a depresszió, az epilepszia, a korai kezdetű Parkinson-betegség (Butcher et al., 2013) kialakulásának rizikója is. A változatos tünetegyüttesek nehezítik a szindróma felismerését a klinikai rutinban.

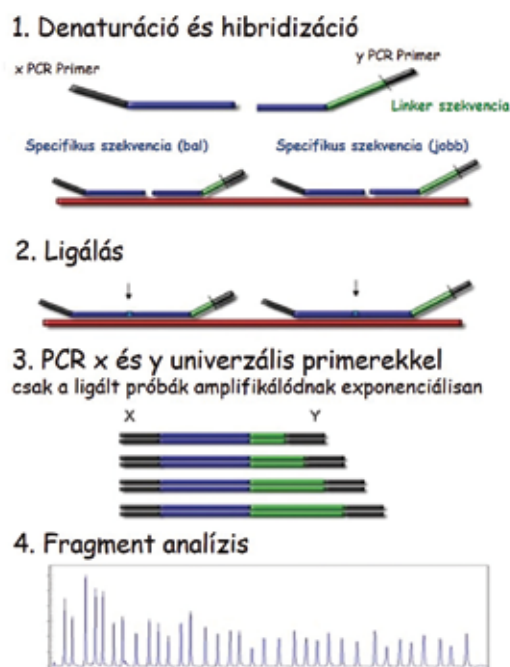
Ebben a kromoszomális régióban, mint ahogy számos más helyen is a genomban, több szegmentális duplikáció figyelhető meg. Ezek szekvenciái nagymértékben azonosak, így hajlamossá teszik ez egye-

det nonallélikus homológ rekombinációra (NAHR). Ennek eredménye lehet deléció, duplikáció és inverzió is (Shaffer and Lupski, 2000; Feuk et al., 2006). Az ilyen szegmentális duplikációk, más néven ismétlődő régiók (low copy repeats – LCR) a meiózis során összefekve egyenlőtlen crossing overt tesznek lehetővé a kromoszómák között, vagy a kromoszómán belül is okozhatnak átrendeződést. Ez utóbbiak felelősek a 22q11 régió deléciójáért is (Saitta et al., 2004; Edlmann et al., 1999a). A deléció az esetek közel 90%-ában *de novo* mutáció, míg 10%-ában autoszomális dominánsan öröklődik (Jonas et al., 2014). Ennek eredményeképpen több mint 85%-ban egy körülbelül 3 Mb-nyi régióban található a hemizigóta deléció az LCRA és LCRD között (1. ábra). Körülbelül 10%-ban pedig egy rövidebb, körülbelül 1,5 Mb nagyságú régió deletálódik az LCRA és LCRB között. Ezt DiGeorge kritikus régióknak is hívják (DGCR). Megfigyelhetők variációk a töréspontok pontos helyében (Jonas et al., 2014). (A többi esetben a törés lehet az A és C (2%-ban) között vagy atipikus végpontok között (Emanuel, 2008; Bassett et al., 2008; Edlmann et al., 1999b)).

A szindrómához kapcsolódó főbb fenotípusok penetranciája és változékony expresszivitása nagyrészt függetlennek látszik a deléció nagyságától, vagyis nincs kimutatható különbség az 1,5 és a 3 Mb deléciót hordozó személyek fenotípusában, ami arra utal, hogy a tünetekhez köthető gének a rövidebb, 1,5 Mb-s szakaszon helyezkednek el (Weksberg et al., 2007; Jonas et al., 2014; Karayiorgou et al., 2010). Bár vannak tanulmányok, melyek mRNS és fehérje szinten vizsgálják a 22q11 deléciót, nehézséget okoz a fenotípusok egyes génekhez kapcsolása (van Beveren et al., 2012; de la Morena et al., 2013; Ye et al., 2012; Das Chakraborty et al., 2012; Sellier et al., 2014). A leggyakoribb deléció 90 gént tartalmaz. A 90 gén kicsit több mint fele (46 gén) kódol fehérjét és a legtöbb ezek közül (41 gén) expresszálódik az agyban. Ezen kívül 27 pszeudogén, 10 ncRNS és 7 miRNS található a DGCR-ben. A rövidebb, ~1.5 Mb szakaszon 55 gén található, melyek közül 30 kódol fehérjét és 27 fejeződik ki az agyban. Több tanulmány is dokumentálta 32 gén csökkent expresszióját vérből vizsgálva a 22q11 deléciós betegeknél kontrollokhoz viszonyítva (van Beveren et al., 2012; Maynard et al., 2003; Sellier et al., 2014).

Az állatmodellek alapvető szerepet játszanak ezen a kutatási területen. Az egér modellek már most is hasznosnak bizonyultak a 22q11 régióban található bizonyos gének és a fenotípusok közötti összefüggés vizsgálatában (Guna et al., 2015). Tavalyig a régió 40 humán génjéből, amelyek homológja megtalálható

1. ábra A multiplex ligáció alapú próba amplifikáció (MLPA) menete



A próbák tartalmaznak egy specifikus régiót (kék), változó hosszúságú linker régiót (zöld), amelynek hossza alapján egyszerű gélelektroforézissel azonosítani lehet a termékeket, továbbá két fajta (minden terméknél ugyanolyan) primerek bekötését lehetővé tevő x, y régiókat (szürke).
 Forrás: mlpa.com – az MRC – Holland cég honlapja.

egérben, 31 homozigóta knockout (KO) egér modell készült el – melyekben az adott génről nem készült fehérje. Emellett 26 *C. elegans* KO vagy knock down (KD) változat, melyben a fehérjeexpresszió csökkent volt, 41 ecetmuslica (*D. melanogaster*) KO vagy KD, 22 zebrahal (*D. rerio*) KO vagy KD készült (Guna et al., 2015). Mivel a szindróma fenotípusos megjelenése legalább részben a 22q11 régióban csökkent géndózis-hoz kapcsolható, ami aztán a normál fehérjefunkciót gátolja (Meechan et al., 2006), a KD modellek fontossága jelentős. 17 gén található meg mind a négy modell állatban. Ezek: PRODH, DGCR14, SLC25A1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, TBX1, TXNRD2, TANGO2, DGCR8, TRMT2A, MED15, PI4KA, SNAP29, AIFM3, SLC7A4. Közülük 16 (94.1%) az emberi agyban is kifejeződik (Guna et al., 2015). A konzerváltság ezen gének kulcsszerepére enged következtetni.

Mivel ugyanaz a delécióméret többféle diagnózist is eredményezhet, azaz a genetikai hatás pleiotróp, adódhat a feltételezés, hogy a fejlődési neuropszichiátriai betegségek átfedő entitások (Hiroi et al., 2013). Felmerül a kérdés, mi okozza a tünetek

ilyen széles spektrumú változatosságát. Több genetikai mechanizmus jön szóba.

- Recesszív mutációk** az intakt kromozómán, melyek hatása a deléció miatt felszínre kerül, vagy epigenetikai hatások lehetségesek, de ez kevésbé vizsgált területe a 22q11 kutatásnak.
- Valószínűbb, hogy az **eltérő töréspontok**, így a deléció méretének és határainak változatossága miatt alakulnak ki a különböző fenotípusok.
- Szerepet játszhat az **intakt kromozóma allélikus variációja**, ami hatással lehet a translációra, mivel nincs kompenzáló másik allél. Erre példa a DGCR-ben található, sokat vizsgált katekol-O-metil transferáz (COMT) gén 158-as pozíciójában lévő Val – Met variáció. A COMT által kódolt poszt-szinaptikus enzim modulálja a prefrontális kortikális dopamin lebomlást. A 158-as pozícióban valinnal rendelkezők posztmortem dorzolaterális prefrontális cortexében 40%-kal magasabb a COMT enzim aktivitása, mint a metioninnal rendelkezőkében (Chen et al., 2004). Ezt a polimorfizmust egészségesekben is tanulmányozták és kapcsolatba hozták az

exekutív funkciók és a pszichiátriai betegségek kifejlődésében tapasztalható különbségekkel is. A COMT-hiányos egerekben a DA szint normális, de az extracelluláris térből való eltávolítás kétszer lassabb (Yavich et al., 2007), amiből következtethet, hogy a 22q11-ben tapasztalható COMT hemizigótaság esetleg megemelkedett DA kibocsátás esetén befolyásolja a dopamin funkciót, mint például stresszes élethelyzetekben.

- d. Ezen kívül **episztatikus interakciók** is szerepet játszhatnak, amikor az intakt kromoszómán az egyik gén módosítja a másik hatását – például a COMT és a prolin dehidrogenáz 1 (PRODH) gének interakciója – is befolyásoló tényezők lehetnek (Jonas et al., 2014). A PRODH terméke a prolint alakítja glutamáttá a mitokondriumban. Ennek az enzimnek a diszfunkcióját már korábban összekapcsolták pszichiátriai betegségek megjelenésével. (Jacquet et al., 2002) PRODH-hiányos egerek prefrontális kortexében COMT upreguláció figyelhető meg, valószínűleg a DA transzmisszió fenntartása érdekében. Ezen kívül az egerek agyi tevékenysége akkor volt a legkevésbé működőképes, amikor a PRODH enzim aktivitása megnövekedett és ugyanakkor a COMT enzim aktivitása lecsökkent (Paterlini et al., 2005).
- e. A DGCR-ben található **miRNS gének egy kópiában való jelenléte** az érett miRNS inszufficienciáját okozza, ami jelentősen befolyásolja a cél-génekről készülő fehérje funkcióját (Stark et al., 2008). Például a Dgrc8+/- egérmódel 22q11DS-hez köthető kognitív- és viselkedésdeficitet mutatott, és a prefrontális kortex megváltozott rövidtávú plaszticitását (Stark et al., 2008). Ezekben az egerekben a dendritek rendellenes elágazását és az interneuronok abnormális kortikális migrációját találták. A miR-25 és miR-185 a szarko(endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATPáz, a Ca^{2+} adenosin trifoszfátáz 2 (SERCA2) ismert szabályozói. A Dgrc8+/- egérmódelben megfigyelhető szinaptikus diszfunkció, ugyanakkor miR-25 és miR-185 depléción is. A következményes SERCA2 upreguláció elvezethet az ennél a módelnél megfigyelhető megváltozott szinaptikus plaszticitáshoz a hippocampusz területén (Earls et al., 2012), mely a szkizofréniában is érintett agyterület. A mikroRNS-függő SERCA2 diszreguláció hozzájárulhat a tanulásban és neuropszichiátriában megfigyelhető fenotípusokhoz. 22Q11DS-ban szenvedő emberekben is kimutatták a vérből a MIR185 csökkent mennyiségét (de la Morena et al., 2013).

Neuroanatómiaiilag globális agytérfogot csökkenést írtak le 22q11 szindrómában, ami főleg a parietális lebenyben tapasztalható (Gothelf et al., 2008; Tan et al., 2009). Érdekes, hogy a csökkenés mértékében megfigyelhető egy rostrális-kaudális grádiens, azaz például az okcipitális lebeny és a cerebellum csökkenése feltűnőbb, míg a frontális lebeny relatíve érintetlen, legalábbis gyermekekben. A kor előrehaladtával a különböző frontotemporális régiókban is megfigyelhető differenciált térfogat csökkenés, ami szerepet játszhat a fiatal felnőtt korban bekövetkező pszichózis iránti sérülékenységekben (Jonas et al., 2014).

Kitekintésképpen megjegyezhetjük, hogy a funkcionális genomika új eszközeivel közelebb lesznek hozhatók a 22q11 szindróma genetikai és fenotípusos jellemzői. Ilyen a pluripotens őssejt technika, mellyel *in vivo* modellezhető az idegsejtek működése. Ennek során 22Q11DS betegekből és egészséges személyekből vett, könnyen elérhető sejtek, például fibroblasztok visszaprogramozhatók neurális progenitor sejtekké, majd neuronokká. Így emberi deléción és intakt neuronok hasonlíthatók össze sok szempontból, mint például a sejtek szerkezete, elektrofiziológiája, szinaptikus tevékenysége.

Klinikai vonatkozások

Bár lényegi tüneteit illetően a 22q11 deléciónal rendelkező és nem rendelkező szkizofréniás fenotípus megkülönböztethetetlen egymástól, egy kanadai tanulmány alapján a clozapinra adott válaszban különbségek fedezhetőek fel (Butcher et al., 2015). A 22Q11DS-betegek kisebb dózis alkalmazása mellett is javulást mutattak, viszont mellékhatásokat gyakrabban detektáltak náluk, illetve ezek a mellékhatások súlyosabbak voltak, mint a másik csoport esetében. Vagyis a clozapine-ra adott ritka, súlyos mellékhatások (epilepsziás görcsök, súlyos neutropénia, miokarditisz) tekintetében a 22Q11DS-ban szenvedők felülreprezentáltak (Butcher et al., 2015).

Egy másik tanulmány azt mutatta be, hogy a 22q11 deléciónal rendelkező felnőttek esetében a korai kezdetű Parkinson-kór (PD) szignifikánsan gyakoribb, mint az átlag populációban. Az antipszichotikus terápia a PD diagnózisát 10 évvel késleltette (Butcher et al., 2013). A 22q11 genetikai kimutatása tehát jelentősen hozzájárulhat a személyre szabott szkizofréniás ellátáshoz. Felvetődik, hogy a Semmelweis Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika biobankjának szkizofréniás páciensei között milyen arányban található 22q11.2 deléciónal rendelkezők. A kérdés megválaszolásához

1. táblázat A vizsgálatban résztvevő páciensek klinikai és demográfiai adatai (CPZ eq – klórpromazin ekvivalens, PANSS - Positive and Negative Syndrome Scale)

	Nem		Kor	Oktatás (év)	Betegség tartam (év)	CPZ eq	PANSS neg pont	PANSS poz pont	PANSS gen pont
ff%	46	átlag	37,7	12,7	8,9	455,1	19,9	17,7	40,5
nő%	54	SD	11,8	3,1	9	356,2	5,2	4,9	8,8

egy, a klinikai genetikai diagnosztikában még nem használt módszert, a multiplex ligációs alapú próba amplifikációt (MLPA) állítottuk be. Az eredmények távlatilag átvihetők a klinikai gyakorlatba és az alap-kutatásba.

VIZSGÁLATI CSOPORT, MÓDSZEREK

Jelen vizsgálatunkban a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika biobankjában szereplő, 315 DSM-IV szerint szkizofréniával diagnosztizált páciens DNS mintáit vizsgáljuk a 22q11.2 deléció szempontjából. Pozitív kontrollként ismert DiGeorge-szindrómás gyermek mintája szolgált. A páciensek demográfiai és klinikai adatait az 1. táblázat foglalja össze. A DNS minták izolálása teljes vérből történt, só-precipitációs módszerrel (Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit).

A klinikai genetikai diagnosztikában jelenleg a kromoszómákon végezhető fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technikát alkalmazzák DiGeorge-szindróma gyanúja esetén. Mi a vizsgálathoz multiplex ligációs alapú próba amplifikációt (MLPA) használunk, amely polimeráz láncreakció (PCR) alapú technológia (1. ábra), validitását több vizsgálatban is bizonyították (Jalali et al., 2008). (Reagens: SALSA P250 DiGeorge Probemix kit és EK1-FAM SALSA MLPA reagent kit, MRC-Holland.)

Röviden a módszer a következő lépésekből áll: DNS denaturáció és hibridizáció a próbákkal, a próbák ligációja, multiplex PCR reakció, a kapott fragmentek elektroforetikus elválasztása, eredmények elemzése. A próbaelegyenben 48 MLPA próba van, melyekből 29 a leggyakrabban deletálódó 22q11.2 régióra esik, 19 pedig hasonló fenotípusokkal járó ritkább deléciókat detektál a genom egyéb részein. Ezek egyben mintán belüli referencia próbakként is szolgálnak. A próbák 130-500 bázispáros terméket hoznak létre és amplifikálnak. Minden próba 3 részből áll: először tartalmaz egy egyedi szakaszt, mely a vizsgált DNS-hez hibridizál, másodszor egy kiegészítő szakaszt, mely minden próbapáron más

és más hosszúságú, lehetővé téve a próbák nagyság szerinti elválasztását és azonosítását a folyamat végén, a gélelektroforézis szakaszában. Végül, harmadszor a próbák végén minden próbapáron azonos PCR primer szakasz található, mely egy csőben a sokféle DNS szakasz amplifikációját teszi lehetővé egy primer párral. Ha a próba bekötött a megfelelő helyre, a próbapárok egymás mellé kerülnek, és csakis ekkor a ligáz összekapcsolja őket. Az így kialakult összekapcsolt próbapár képes az amplifikálás során feldúsulni, és ennek mennyisége detektálható. Az amplifikálást FAM fluoreszcens festékkel jelölt primerrel végeztük. Ha a mintában lévő DNS egyik vagy mindkét szálán lévő deléció/duplikáció vagy pontmutáció miatt a próba nem képes kapcsolódni, a végtermékben arányosan kevesebb (esetünkben a hemizigóta deléció miatt fele mennyiségű) PCR termék képződik, mint a kontroll mintában, azon a DNS szakaszon található próbákkal, melyeket a deléció érint. A reakciótermékekben a kapott fragmentek elválasztása kapilláris elektroforézissel, Applied Biosystem (ABI) 3100 Avant, illetve ABI 3500 készülékeken történt.

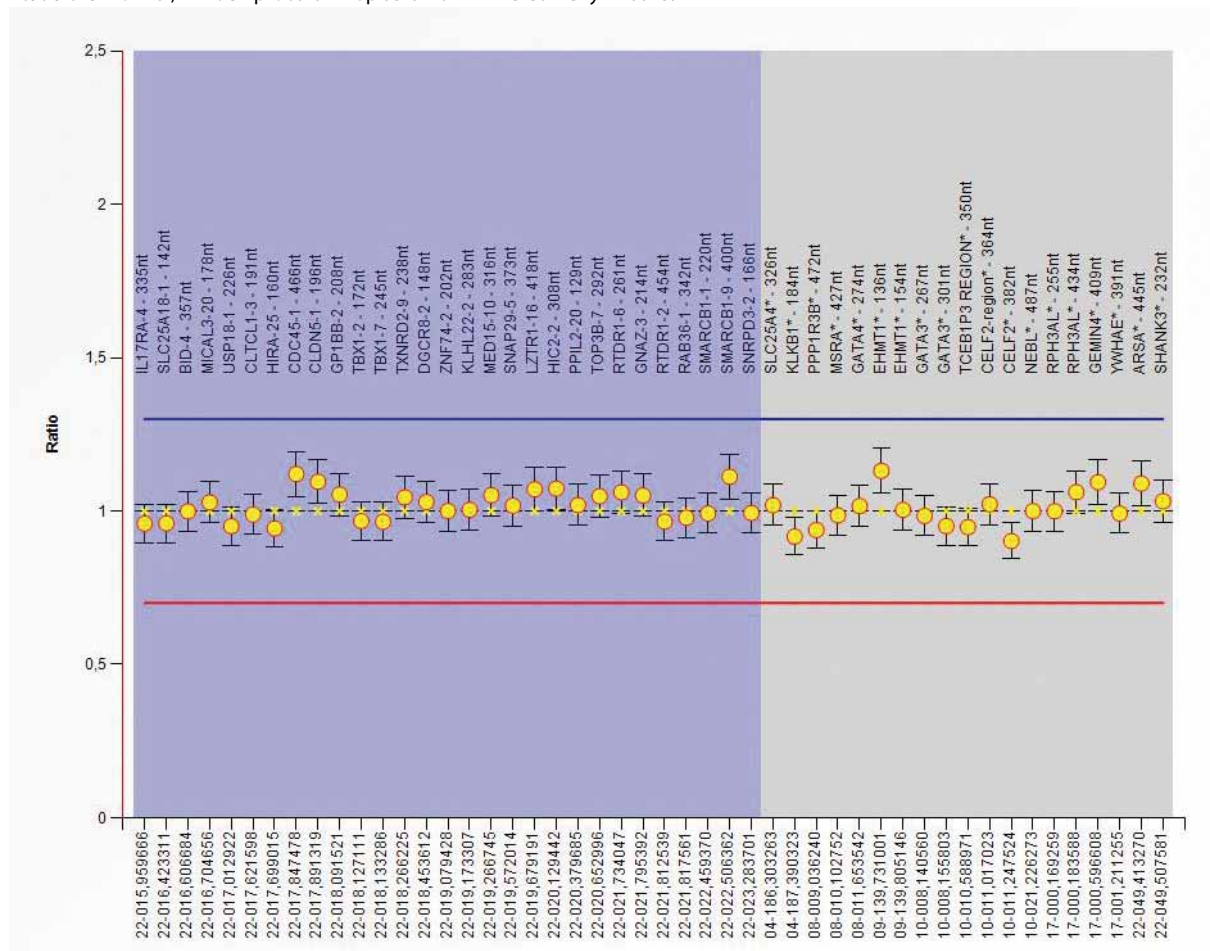
EREDMÉNYEK

A módszertant beállítottuk, az MLPA módszerrel detektálható a 22q11.2 régió deléciója (2. ábra a. és b.), a normál minták elkülöníthetők a deléciós kontroll mintától. A kontroll minta deléciója megfelel a leggyakoribb, 3 Mb hosszúságú formának (ez található az esetek 85%-ában). A szkizofréniás DNS bank 315 mintája volt sikeresen vizsgálható, ezeknél kaptunk egyértelmű eredményt. Ezen minták között nem találtunk deléciót ebben a kromoszomális régióban, minden esetben normál géndózsist találtunk, tehát a mintánkban a 22Q11DS előfordulási gyakorisága 0% volt.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A beállított MLPA módszer előnye, hogy nem csak a deléció tényét, hanem nagyságát is kimutatja, hiszen a hemizigóta delécióról fele mennyiségű amplifikátum

2.a. ábra Normál, minden próbára 2 kópiaszámú MLPA eredmény vizuálisan



Szkizofrén beteg DNS mintája, 22q11.2 régió. Coffalyser programmal kiértékelve (letölthető: mlpa.com). Minden próba 1 körüli értéket mutat, a 22 kromoszómán levők (kék háttér) és a más kromoszómákon lévő kontroll próbák is (szürke háttér).

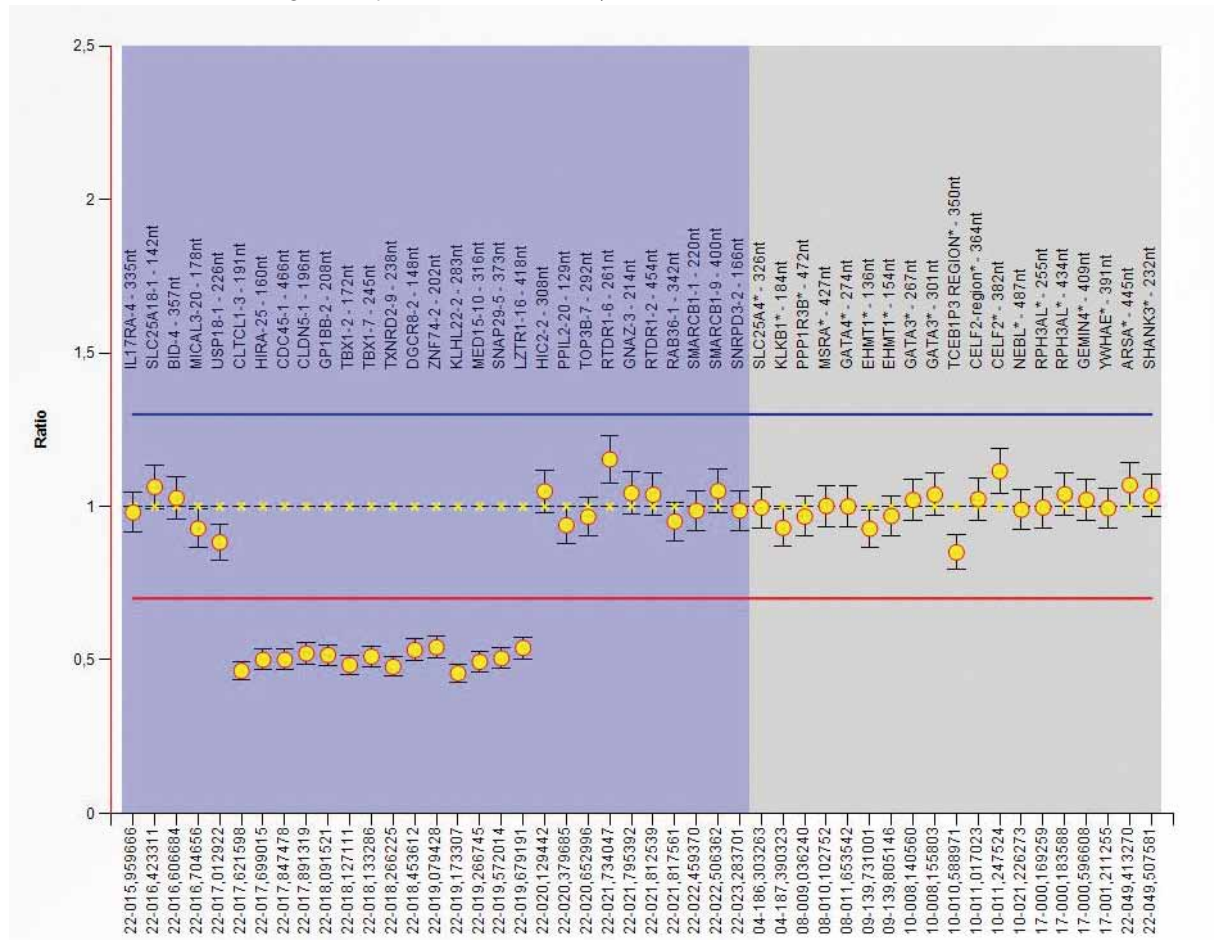
készül, míg a deléciót környező DNS szakaszokról már a kontroll DNS-sel azonos mennyiségű amplifikátum. Így lehet megállapítani a deléció határait (3. ábra). Előnye továbbá, hogy a FISH-hez képest olcsóbb, egyszerűbb, nem szükségesek élő sejtek és az időigényes kromoszómapreparálás, csak DNS, ezért meglévő DNS minta gyűjteményen is használható. Távolilag felmerül a módszer klinikai szűrésben való alkalmazhatóságának kérdése.

A pszichiátriai gyakorlatban a külföldi adat szerint 100 szkizofrén betegből átlagosan egy hordozza a 22Q11 deléciót. Nem egyértelmű, hogy ez az előfordulási gyakoriság magyar szkizofrén betegek között is hasonló-e, és ha igen, akkor ezek az esetek általában felismeretlenek maradnak-e a mindennapi gyakorlatban. Jelen vizsgálatunkban 315 szkizofrénben szenvedő beteg DNS mintáit elemezve

nem találtunk 22Q11 deléciót. Az irodalmi adatok között található legmagasabb érték, amit a 22q11 prevalenciájára szkizofréniaiban mértek, 5,33% (Sporn et al., 2004). Megfigyeltek több esetben 2% körüli prevalenciát (Karayiorgou et al., 1995; Wiehahn et al., 2004), 0,3%, illetve 1% körüli értéket (Horowitz et al., 2005; Arinami et al., 2001) és több vizsgálatban, hozzánk hasonlóan, 0%-ot kaptak (Ivanov et al., 2003; Hoogendoorn et al., 2008). Ezt a 2. táblázat mutatja. Hoogedorn és mtsai metaanalízise alapján ezeknek a cikkeknek az átlagából 2133 szkizofrénia páciensre a prevalencia 0,75%-ra jön ki (Hoogendoorn et al., 2008).

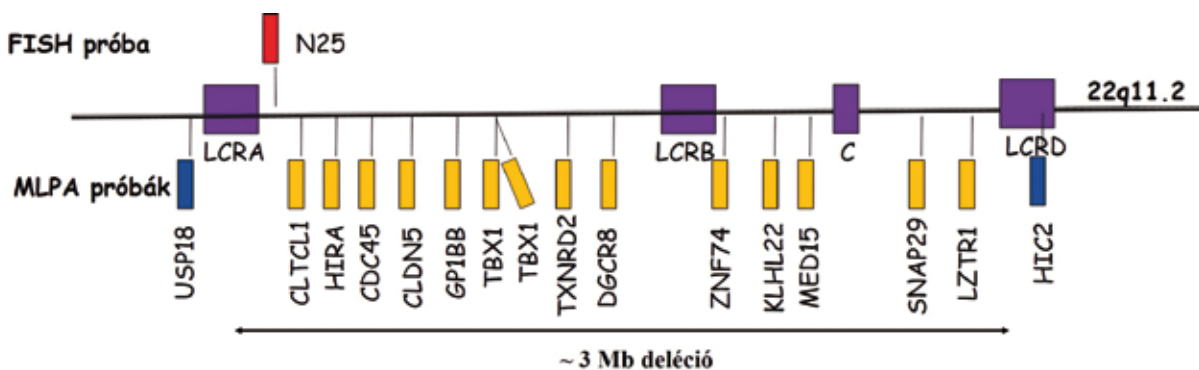
Vizsgálatunk negatív eredménnyel zárult, de a módszertan alkalmazhatóságát bizonyítottuk. Eredményeink nem egyedülállóak, tekintve, hogy más szkizofrénia mintákban is regisztráltak már 0%-os

2.b. ábra Deléciók, kb 3 Mb régióra 1 kópiaszámú MLPA eredmény vizuálisan



DiGeorge-szindrómás gyermek DNS mintája, 22q11.2 régió. Coffalyser programmal kiértékelve (mlpa.com). 14 próba összefüggően a DiGeorge-szindrómára jellemző régióban 0,5 körüli (egy kópiára utal), előtte, utána 1 körüli (2 kópiára utal) értéket mutat (kék háttér), ahogy a más kromoszómákon lévő kontroll próbák is (szürke háttér).

3. ábra A 22q11.2 régióban a leggyakoribb 3Mb nagyságú deletált rész ábrázolása



Alul a használt MLPA próbák láthatók, melyek a régióban található génekre specifikusak. Sárga szín mutatja a DiGeorge kontroll mintánkban csak 1 kópiában amplifikálódó próbákat, sötéték a deletált régió kívülieket. A kromoszóma képe fölött a klinikai genetikai diagnosztikai gyakorlatban alkalmazott, N25 jelű FISH próba elhelyezkedése látható. LCRA, LCRB, LCRC, LCRD (lila téglalapok) – ismétlődő régiók (low copy repeats), melyek homológ rekombinációja okozza a deléciókat.

2. táblázat A táblázat tartalmazza a több tanulmány által, különböző szkizofrén populációkban meghatározott 22q11.2 deléció gyakoriságát, a vizsgált mintaszámmal együtt (Hoogendoorn et al., 2008).

Tanulmány	Deléciós minták / össz. mintaszám	Prevalencia	Diagnózis
Karayorgou et al. (1995)	2/100	2%	NA
Arinami et al. (2001)	1/300	0.3%	NA
Ivanov et al. (2003)	1/329	0.3%	felnttkori diagnózis
	0/134	0%	korai diagnózis
	0/7 *	0%	gyermekkori diagnózis
Wiehahn et al. (2004)	2/85	2.35%	korai diagnózis
Sporn et al. (2004)d	4/75 *	5.33%	gyermekkori diagnózis
Horowitz et al. (2005)	6/634	0.95%	korai diagnózis
Hoogendoorn et al. (2008)	0/311	0%	NA
Jelen tanulmány	0/315	0%	felnttkori diagnózis
Rees et al. (2014)	56/19,084	0,3%	NA

gyakoriságot. Mivel az előfordulási gyakorisága ennek a mutációnak szkizofréniában 1% körüli, feltételezhető, hogy mintánk statisztikai ereje nem volt megfelelő, és nagyobb esetszám tesztelésére van szükség deléciós minták azonosításához. Az is elképzelhető, hogy a betegek útja itthon más, mint külföldön, vagyis a DiGeorge-szindrómás gyermekek nagy része gyermekkorban felismerésre kerül. Ezt követően a kezelésük nem folytatódik a felnőtt pszichiátriai ellátásban. Ettől függetlenül fontos lenne Magyarországon megszervezni a 22Q11DS gyermekek és felnőttek pszichiátriai ellátását speciális ambulanciákon. Az említett minor fejlődési anomáliák vagy kardiológiai, endokrinológiai, hematológiai eltérések, korai Parkinson-kór, átlagtól eltérő clozapinhatás, mellékhatás esetén gondoljunk klinikai genetikai konzíliumra.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS. Köszönjük Prof. Dr. Fekete Györgynek és Kiss Eszternek (Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyerekgyógyászati Klinika) a 22q11.2 deléciós pozitív kontroll DNS-minta rendelkezésünkre bocsátását. A kutatás a Nemzeti Agykutatási Program KTIA_NAP_13-2014-0011 számú pályázata támogatásával történik.

LEVELEZŐ SZERZŐ: dr. Réthelyi János, Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika, 1083 Budapest, Balassa utca 6.
E-mail: rethelyi.janos@med.semmelweis-univ.hu

IRODALOM

- Arinami, T., Ohtsuki, T., Takase, K., Shimizu, H., Yoshikawa, T., Horigome, H., Nakayama, J., Toru, M. (2001) Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population. *Schizophr Res*, 52: 167-70.
- Bassett, A. S., Chow, E. W., Husted, J., Weksberg, R., Caluseriu, O., Webb, G. D., Gatzoulis, M. A. (2005) Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome. *Am J Med Genet A*, 138: 307-13.
- Bassett, A. S., Marshall, C. R., Lionel, A. C., Chow, E. W., Scherer, S. W. (2008) Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*, 17: 4045-53.
- Bassett, A. S., McDonald-McGinn, D. M., Devriendt, K., Digilio, M. C., Goldenberg, P., Habel, A., Marino, B., Oskarsdottir, S., Philip, N., Sullivan, K., Swillen, A., Vorstman, J., International 22q11.2 Deletion Syndrome, C. (2011) Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*, 159: 332-9 e1.
- Butcher, N. J., Fung, W. L., Fitzpatrick, L., Guna, A., Andrade, D. M., Lang, A. E., Chow, E. W., Bassett, A. S. (2015) Response to clozapine in a clinically identifiable subtype of schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 206: 484-91.
- Butcher, N. J., Kiehl, T. R., Hazrati, L. N., Chow, E. W., Rogaeva, E., Lang, A. E., Bassett, A. S. (2013) Association between early-onset Parkinson disease and 22q11.2 deletion syndrome: identification of a novel genetic form of Parkinson disease and its clinical implications. *JAMA Neurol*, 70: 1359-66.
- Chen, J., Lipska, B. K., Halim, N., Ma, Q. D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B. S., Hyde, T. M., Herman, M. M., Apud, J., Egan, M. F., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R. (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*, 75: 807-21.

8. Das Chakraborty, R., Bernal, A. J., Schoch, K., Howard, T. D., Ip, E. H., Hooper, S. R., Keshavan, M. S., Jirtle, R. L., Shashi, V. (2012) Dysregulation of DGCR6 and DGCR6L: psychopathological outcomes in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Transl Psychiatry*, 2: e105.
9. de la Morena, M. T., Eitson, J. L., Dozmorov, I. M., Belkaya, S., Hoover, A. R., Anguiano, E., Pascual, M. V., van Oers, N. S. (2013) Signature MicroRNA expression patterns identified in humans with 22q11.2 deletion/DiGeorge syndrome. *Clin Immunol*, 147: 11-22.
10. Earls, L. R., Fricke, R. G., Yu, J., Berry, R. B., Baldwin, L. T., Zakharenko, S. S. (2012) Age-dependent microRNA control of synaptic plasticity in 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J Neurosci*, 32: 14132-44.
11. Edelmann, L., Pandita, R. K., Morrow, B. E. (1999a) Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet*, 64: 1076-86.
12. Edelmann, L., Pandita, R. K., Spiteri, E., Funke, B., Goldberg, R., Palanisamy, N., Chaganti, R. S., Magenis, E., Shprintzen, R. J., Morrow, B. E. (1999b) A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet*, 8: 1157-67.
13. Emanuel, B. S. (2008) Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*, 14: 11-8.
14. Feuk, L., Carson, A. R., Scherer, S. W. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7: 85-97.
15. Fung, W. L., Butcher, N. J., Costain, G., Andrade, D. M., Boot, E., Chow, E. W., Chung, B., Cytrynbaum, C., Faghfoury, H., Fishman, L., Garcia-Minaur, S., George, S., Lang, A. E., Repetto, G., Shugar, A., Silversides, C., Swillen, A., van Amelsvoort, T., McDonald-McGinn, D. M., Bassett, A. S. (2015) Practical guidelines for managing adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med*, 17: 599-609.
16. Goodship, J., Cross, I., LiLing, J., Wren, C. (1998) A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. *Arch Dis Child*, 79: 348-51.
17. Gothelf, D., Schaer, M., Eliez, S. (2008) Genes, brain development and psychiatric phenotypes in velo-cardio-facial syndrome. *Dev Disabil Res Rev*, 14: 59-68.
18. Guna, A., Butcher, N. J., Bassett, A. S. (2015) Comparative mapping of the 22q11.2 deletion region and the potential of simple model organisms. *J Neurodev Disord*, 7: 18.
19. Hiroi, N., Takahashi, T., Hishimoto, A., Izumi, T., Boku, S., Hiramoto, T. (2013) Copy number variation at 22q11.2: from rare variants to common mechanisms of developmental neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, 18: 1153-65.
20. Hoogendoorn, M. L., Vorstman, J. A., Jalali, G. R., Selten, J. P., Sinke, R. J., Emanuel, B. S., Kahn, R. S. (2008) Prevalence of 22q11.2 deletions in 311 Dutch patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, 98: 84-8.
21. Horowitz, A., Shifman, S., Rivlin, N., Pisante, A., Darvasi, A. (2005) A survey of the 22q11 microdeletion in a large cohort of schizophrenia patients. *Schizophr Res*, 73: 263-7.
22. Ivanov, D., Kirov, G., Norton, N., Williams, H. J., Williams, N. M., Nikolov, I., Zvetkova, R., Stambolova, S. M., Murphy, K. C., Toncheva, D., Thapar, A., O'Donovan, M. C., Owen, M. J. (2003) Chromosome 22q11 deletions, velo-cardio-facial syndrome and early-onset psychosis. Molecular genetic study. *Br J Psychiatry*, 183: 409-13.
23. Jaquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., Bou, J., Petit, M., Campion, D., Frebourg, T. (2002) PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet*, 11: 2243-9.
24. Jalali, G. R., Vorstman, J. A., Errami, A., Vijzelaar, R., Biegel, J., Shaikh, T., Emanuel, B. S. (2008) Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human mutation*, 29: 433-40.
25. Jonas, R. K., Montojo, C. A., Bearden, C. E. (2014) The 22q11.2 deletion syndrome as a window into complex neuropsychiatric disorders over the lifespan. *Biol Psychiatry*, 75: 351-60.
26. Karayiorgou, M., Morris, M. A., Morrow, B., Shprintzen, R. J., Goldberg, R., Borrow, J., Gos, A., Nestadt, G., Wolyniec, P. S., Lasseter, V. K., et al. (1995) Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7612-6.
27. Karayiorgou, M., Simon, T. J., Gogos, J. A. (2010) 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 11: 402-16.
28. Maynard, T. M., Haskell, G. T., Peters, A. Z., Sikich, L., Lieberman, J. A., LaMantia, A. S. (2003) A comprehensive analysis of 22q11 gene expression in the developing and adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 14433-8.
29. Meechan, D. W., Maynard, T. M., Wu, Y., Gopalakrishna, D., Lieberman, J. A., LaMantia, A. S. (2006) Gene dosage in the developing and adult brain in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. *Mol Cell Neurosci*, 33: 412-28.
30. Paterlini, M., Zakharenko, S. S., Lai, W. S., Qin, J., Zhang, H., Mukai, J., Westphal, K. G., Olivier, B., Sulzer, D., Pavlidis, P., Siegelbaum, S. A., Karayiorgou, M., Gogos, J. A. (2005) Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. *Nat Neurosci*, 8: 1586-94.
31. Saitta, S. C., Harris, S. E., Gaeth, A. P., Driscoll, D. A., McDonald-McGinn, D. M., Maisenbacher, M. K., Yersak, J. M., Chakraborty, P. K., Hacker, A. M., Zackai, E. H., Ashley, T., Emanuel, B. S. (2004) Aberrant interchromosomal exchanges are the predominant cause of the 22q11.2 deletion. *Hum Mol Genet*, 13: 417-28.
32. Sellier, C., Hwang, V. J., Dandekar, R., Durbin-Johnson, B., Charlet-Berguerand, N., Ander, B. P., Sharp, F. R., Angkustsiri, K., Simon, T. J., Tassone, F. (2014) Decreased DGCR8 expression and miRNA dysregulation in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *PLoS One*, 9: e103884.
33. Shaffer, L. G., Lupski, J. R. (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34: 297-329.
34. Sporn, A., Addington, A., Reiss, A. L., Dean, M., Gogtay, N., Potocnik, U., Greenstein, D., Hallmayer, J., Gochman, P., Lenane, M., Baker, N., Tossell, J., Rapoport, J. L. (2004) 22q11 deletion syndrome in childhood onset schizophrenia: an update. *Mol Psychiatry*, 9: 225-6.
35. Stark, K. L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W. S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A. A., Karayiorgou, M., Gogos, J. A. (2008) Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet*, 40: 751-60.
36. Sullivan, P. F., Kendler, K. S., Neale, M. C. (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*, 60: 1187-92.
37. Tan, G. M., Arnone, D., McIntosh, A. M., Ebmeier, K. P. (2009) Meta-analysis of magnetic resonance imaging studies in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (velocardiofacial syndrome). *Schizophr Res*, 115: 173-81.
38. van Beveren, N. J., Krab, L. C., Swagemakers, S., Buitendijk, G. H., Boot, E., van der Spek, P., Elgersma, Y., van Amelsvoort, T. A. (2012) Functional gene-expression analysis shows involvement of schizophrenia-relevant pathways in patients with 22q11 deletion syndrome. *PLoS One*, 7: e33473.

39. Weksberg, R., Stachon, A. C., Squire, J. A., Moldovan, L., Bayani, J., Meyn, S., Chow, E., Bassett, A. S. (2007) Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Hum Genet*, 120: 837-45.
40. Wiehahn, G. J., Bosch, G. P., du Preez, R. R., Pretorius, H. W., Karayiorgou, M., Roos, J. L. (2004) Assessment of the frequency of the 22q11 deletion in Afrikaner schizophrenic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 129B: 20-2.
41. Yavich, L., Forsberg, M. M., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., Mannisto, P. T. (2007) Site-specific role of catechol-O-methyltransferase in dopamine overflow within prefrontal cortex and dorsal striatum. *J Neurosci*, 27: 10196-209.
42. Ye, T., Lipska, B. K., Tao, R., Hyde, T. M., Wang, L., Li, C., Choi, K. H., Straub, R. E., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R. (2012) Analysis of copy number variations in brain DNA from patients with schizophrenia and other psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*, 72: 651-4.

An attempt to identify 22q11.2 microdeletions in samples of the Hungarian schizophrenia DNA bank by multiplex ligation-based probe amplification (MLPA): literature review, methodology and results

Schizophrenia is a severe debilitating psychiatric disorder, with a typical onset in adolescence or early adulthood. This condition is characterized by heterogeneous symptoms (hallucinations, delusions, disorganized behaviour, affective flattening, and social isolation) and a lifetime prevalence of 0.5-1.2%. In spite of the efforts to uncover the etiology of the disorder, its pathogenesis and neurobiological background are poorly understood. Given the high heritability in schizophrenia, genetic research remains an important area of focus. Besides the common variations of low penetrance – single nucleotide polymorphisms (SNPs) –, rare variants, mainly copy number variations (CNVs) play a role in the genetic architecture of the disorder. The most frequent CNV associated with schizophrenia is the hemizygous deletion of the 22q11.2 region. According to previous research this genetic variant occurs in 1% of the patients and conversely, 25% of the carriers of the 22q11.2 microdeletion will develop schizophrenia. The 22q11.2 deletion syndrome (22Q11DS, velocardiofacial (VCF) syndrome, DiGeorge-syndrome) is usually a childhood diagnosis. Its prevalence is 1:2000–4000 considering all births. Patients can demonstrate heart developmental disorders, craniofacial (elongated face, hypertelorism), immunological (thymus-hypoplasia), endocrinological (hypocalcaemia) abnormalities, and neurodevelopmental alterations, but only a proportion will have these abnormalities due to incomplete penetrance. The variable symptoms complicate the recognition of the syndrome in the day to day medical practice. 25% of the known 22Q11DS patients develop schizophrenia but the risk of neuropsychiatric problems, like autism, ADHD and childhood conduct disorder is also increased, while early onset Parkinson's disease is also more frequent in adults. The schizophrenia phenotype is not distinguishable at the moment in patients with or without the 22q11 deletion. But emerging evidence suggests that early onset Parkinson's disease is more frequent in 22Q11DS and the effects of clozapine treatment could be different in schizophrenia with 22Q11DS. The question arises what is the incidence rate of the 22q11.2 microdeletion among our Hungarian DNA samples with schizophrenia. To answer the question, we utilized a new method used in routine genetic diagnostics, multiplex ligation-based probe amplification (MLPA). Although we genotyped the DNA of 315 Hungarian schizophrenia patients, we found no 22Q11DS in this cohort. The findings are discussed in terms of basic research and their translation into everyday clinical practice.

Keywords: schizophrenia, CNV, 22Q11DS, MLPA, clinical screening