

Válasz Prof. Klivényi Péter bírálatára

Tisztelettel köszönöm Professzor Úrnak, hogy elvállalta az „Endofenotípusok alkalmazása a depresszió patomechanizmusának megismerésében” című MTA Doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm értékes észrevételeit és megjegyzéseit, valamint elismerő szavait. Az alábbiakban szeretnék válaszolni a felvetett kérdéseire.

1. *A manchesteri és a budapesti minták genetikailag mennyire voltak hasonlóak, ugyanis a kelet európai populáció genetikailag meglehetősen heterogénnek tartható (annak ellenére, hogy kaukázusi csoportba soroljuk)*

A kérdés rendkívül fontos a replikálható genetikai eredmények szempontjából, és nagy hangsúlyt fektettünk a manchesteri és budapesti minták lehetséges eltéréseinek vizsgálatára. Minden genotipizált genetikai variáns esetén az allélgyakoriságok populációkon belüli stabilitását a Hardy-Weinberg törvény alapján ellenőriztük, és a stabilitástól szignifikánsan eltérő variánsokat az elemzésből kizártuk. A populációkon belüli allélgyakoriságokat a CEPH (CEU) populáció adataihoz hasonlítottuk (1), melyek az International HapMap projekten keresztül voltak elérhetők (<https://www.genome.gov/10001688/international-hapmap-project>, az eredeti weboldal már nem él) és információt szolgáltatottak az európai populáción belüli várható allélgyakoriságokról. A későbbiekben újabb interneten elérhető adatbázisokat is alkalmaztunk az SNP-k vizsgálatára (pl. dbSNP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi, UCSC Genome Browser <https://genome.ucsc.edu/>, Genecard <https://www.genecards.org/>). 2010-ben jelent meg az első olyan teljes genom szintű tanulmány, mely 5 európai populáció összehasonlításával igazolta, hogy az Európán belüli populációk is jelentős allélfrekvencia-eltéréseket mutatnak, elsősorban az immunitást, bőr- és hajszínt kódoló génekben (2). Az általunk elemzett NewMood populációkban az első két genotipizálási fázis során összesen 183 SNP-t genotipizáltunk, melyek közül 58 esetén tapasztaltunk nominálisan szignifikáns allélfrekvencia-eltérést a budapesti és manchesteri minták között. A mi vizsgálatunkban is az eltérések bizonyos genetikai régiókban halmozódtak, másutt nem voltak észlelhetők. A fentieket figyelembe véve minden olyan elemzésben, ahol a két populáció adatait együttesen vizsgáltuk, ellenőriztük az allélfrekvenciák eltéréseit, a két populációban az eredményeket külön-külön is ellenőriztük, illetve bizonyos esetekben a populáció-változó kovariánsként is szerepelt az elemzésben. A későbbiekben, amikor teljes genom genotipizálásra is lehetőségünk nyílt, meghatároztuk a mintáink stratifikációjára jellemző genetikai főkomponenseket, és azt tapasztaltuk, hogy a populáció-változó és az első főkomponens egymásnak megfelel (pl. a rumináció teljes genom asszociációs vizsgálata esetén a genomikus inflációs faktor - lambda - lényegileg nem változik a kétféle korrekciót összehasonlítva) és kontrollál a két mintában látható stratifikáció jelentős részére (további főkomponensek hozzáadása az analízishez szintén nem változtatja jelentősen a lambdát) (3). Összefoglalva tehát az eltérések ellenére megfelelő matematikai módszerek alkalmazásával a két populáció adatai összehasonlíthatók, illetve együttesen elemezhetők.

2. *Mi alapján történtek a polimorfizmusok kiválasztása, ugyanis pl. a demenciának számos genetikai rizikófaktorát ismert, nemcsak amit a disszertációban vizsgáltak.*

A polimorfizmusok kiválasztása a dolgozatban ismertetett vizsgálatokban két fázisban történt. Az első fázisban irodalomkeresés és a NewMood projekt keretében vizsgált állatmodellek alapján meghatároztuk a depresszió és endofenotípusai szempontjából legfontosabb kandidáns géneket (4). A

kandidáns géneken belül azonosítottuk a korábbiakban vizsgált és funkcionálisan validált SNP-ket, illetve hosszúságpolimorfizmusokat. Ezen felül a kiválasztott génekben az International HapMap projekt (<https://www.genome.gov/10001688/international-hapmap-project>) első eredményeit felhasználva haplotípus jelölő SNP-ket (haplotype tag SNP, htSNP) határoztunk meg. Ez a módszer akkoriban újdonságnak számított, és megalapozta a későbbi teljes genom asszociációs vizsgálatok végzéséhez alkalmas chipek tervezésének módszertanát. A htSNP-k meghatározása a kapcsoltsági egyenlőtlenség (LD, linkage disequilibrium) meghatározásán alapul, mely alapján egy-egy szorosan együtt öröklődő régió esetén elegendő egy, a régiót jelölő htSNP meghatározása ahhoz, hogy az egész régióról információt gyűjthessünk. A második fázisban az első (korai) teljes genom asszociációs vizsgálatok eredményei alapján választottunk olyan szignifikáns SNP-ket (hiteket), melyek a depresszió endofenotípusaihoz kapcsolhatók. A polimorfizmusok kiválasztása során nem törekedtünk más neuropszichiátriai betegség genetikai rizikóvariánsainak teljeskörű elemzésére a depresszió vonatkozásában.

3. Elvégezték-e ugyanazon polimorfizmusok összehasonlító vizsgálatát mindkét populációban?

A vizsgálataink kezdetétől törekedtünk eredményeink replikációjára azokban az esetekben, ahol mindkét populációban rendelkezésre álltak a vizsgált fenotípusok. Például mindkét mintán igazoltuk az endokannabinoid 1 receptor génjének (CNR1) szerepét a vonássonörögés/neuroticizmus kialakulásában (5, 6), vagy a CREB1 (cAMP response element-binding protein-binding protein 1) gén jelentőségét a ruminációban (7, 8). Sikerrel replikáltuk a COMT gén (catechol-o-methyltransferase) és az impulzivitás összefüggését (9), az MTHFD1L gén (monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial) rs11754661 polimorfizmusának asszociációját ruminációval (10), valamint az ATP6V1B2 (ATPase H⁺ Transporting V1 Subunit B2) gén rs1106634 polimorfizmusának összefüggését az élettartam depresszióval (11). Megaanalízis segítségével (a két populáció összevont elemzésével) igazoltuk a szerotonintranszportergén hosszúságpolimorfizmusának (5-HTTLPR) gyenge, de kimutatható főhatását a szorongásos tünetekre, valamint a 5-HTTLPR x negatív életesemény interakció hatását az élettartam depresszióra és a depressziós tünetekre (12). Végül a TPH2 gén és a valószínűségi diszkontálás, valamint a BDNF gén és a rumináció kapcsolata allélikus heterogeneitás figyelembevételével mellett a budapesti mintában is igazolódott (nem közölt eredmények).

4. Végeztek-e funkcionális vizsgálatokat arra vonatkozólag, hogy ezek a variánsok befolyásolják-e egyáltalán az expressziót, a periférián vagy a központi idegrendszerben? Ismert-e ezeknek a géneknek a szövetspecifikus expressziója, vagy szövetspecifikus mRNS isoformái?

Minden esetben vizsgáltuk az általunk elemzett genetikai variánsok potenciális funkcionális hatását. A kandidáns gének funkcionális polimorfizmusai esetén a megfelelő irodalmi adatokra hagyatkoztunk (pl. 5-HTTLPR: (13), BDNF Val66Met (14), COMT Val158/108Met (15), CNR1 promotor variánsok (16)). Minden általunk vizsgált gén expresszálódik a központi idegrendszerben (<https://www.genecards.org/>). A CREB1 gén esetén kimutattuk, hogy a promotor régióban elhelyezkedő rs2253206 polimorfizmus ritkább allélja alacsonyabb hippocampális BDNF koncentrációval mutat kapcsolatot humán posztmortem agyakban. Szintén alacsonyabb hippocampális TrkB fehérjeszinttel mutatott kapcsolatot az NTRK2 gén két általunk vizsgált (rs1187323, rs1187326) promoterikus variánsa (Jason S. Dunham, Ph.D. tézis). Azokban az esetekben, amikor a polimorfizmus funkcionális hatása nem volt ismert, *in silico* adatbázisok segítségével igyekeztünk meghatározni a lehetséges funkciót (pl. dbSNP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi, UCSC Genome Browser

<https://genome.ucsc.edu/>, Genecard <https://www.genecards.org/>). A fentiekén kívül a SNP Function Prediction (FuncPred) alkalmazással is dolgoztunk (<https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>), mely különböző adatbázisok összesítésével információt ad a kiválasztott variáns és LD-ben lévő szomszédjai lehetséges funkciójáról (pl. nsSNP, splicing szabályozó, stop kodon, transzkripció faktor kötőhely, microRNS kötőhely, regulációs valószínűségi pontszám). Az *in silico* funkcionális predikciót lehetővé tevő adatbázisok és alkalmazások folyamatos fejlesztés alatt állnak, időről-időre változnak és bővülnek, így várható, hogy a jövőben még pontosabban meghatározhatóak lesznek az általunk is vizsgált genetikai variánsok funkciói.

5. *A legtöbb genetikai elváltozás, amit vizsgáltak intronikus variáns (közülük többnek a predikciója benignus). Ezek hogyan befolyásolhatják az endofenotípust?*

Tekintettel arra, hogy vizsgálataink során htSNP-ket is alkalmaztunk, több esetben az elemzett variánsok pontos funkciója nem ismert, azonban egy kapcsoltan öröklődő régiót reprezentálnak. Például az ATP6V1B2 gén rs1106634 polimorfizmusa az SNP Function Prediction Tool alapján nem funkcionális, azonban egy közeli LD=0,62-ben lévő polimorfizmus (rs1042426) microRNS kötőhely, mely alapján az általunk jelölt régió funkcionális hatása lehet a gén expressziójára. Ezt a feltételezést erősíti meg, hogy a *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC, <https://www.med.unc.edu/pgc/>) eredményei alapján két, az általunk vizsgált SNP-vel szintén erős LD-ben lévő SNP (rs6586899, $r^2 = 0,96$, and rs4335136, $r^2 = 0,86$) nominálisan szignifikáns kapcsolatot mutat a major depresszióval (11). Legújabb vizsgálatok alapján az intronikus vagy akár a géneket nem kódoló régiókban elhelyezkedő variánsok kifejezhetik hatásukat a három dimenziós kromatinszerkezet kialakulása révén is, mely során közel kerülnek kódoló genetikai régiókhoz és befolyásolhatják azok átíródását úgynevezett cisz-szabályozó domének és transz-szabályozó hubok révén (17).

6. *Van-e eltérés a vizsgált endofenotípusokban/paraméterekben a primeren kialakult major depressziós páciensek és a migrénhez társult depressziós betegek között?*

Sajnos a vizsgált populációs kohortban nincs információnk arról, hogy milyen sorrendben alakult ki a két betegség, vagyis primer major depresszióhoz társult-e a migrén, vagy pedig primer migrénes fejfájásokhoz a depresszió. Egy későbbi kutatásunkban vizsgáltuk a UK Biobank adataiban a migrén és a depresszió kapcsolatát, ahol a betegségek sorrendjére is volt adatunk (18). Ezen eredmények alapján a depresszió és a szorongásosság akkor is erős direkt kapcsolatot mutatott, ha azokat a betegségeket kizártuk, melyek a depresszió fellépése után alakultak ki. Ezzel szemben a különböző fájdalommal járó betegségek, mint például a migrén, már nem mutattak erős direkt kapcsolatot a depresszióval. Mindez arra utalhat, hogy a szorongás és depresszió genetikailag is szoros kapcsolatot mutat, míg a különböző fájdalmakkal járó betegségek kialakulásában a depresszió genetikai rizikófaktorai csak az esetek egy részében játszanak szerepet, míg más esetekben a depressziótól eltérő genetikai háttér következtében alakulnak ki. Ezek az eredmények összhangban vannak Lighthart és munkatársai azon eredményeivel, mely szerint a komorbid depresszióban és migrénben szenvedő személyek genetikailag hasonlóbbak a csak major depresszióban szenvedőkhöz, és kevésbé mutatnak hasonlóságot a csak migrénben szenvedők genetikájával (19). Tehát ez arra utal, hogy a komorbid depresszióban és migrénben szenvedő személyek endofenotípusai is hasonlóságot mutatnak a depresszió endofenotípusaival. A betegségi sorrend kialakulásától függetlenül saját vizsgálatunkban azt tapasztaltuk, hogy a migrénben is szenvedő depressziós személyekre szignifikánsan magasabb neuroticizmus ($p < 0,001$) pontszám jellemző, valamint kevésbé extravertáltak ($p = 0,029$) a csak depressziót tapasztaló személyekhez képest, tehát súlyosabb eltéréseket mutattak a depresszióra jellemző endofenotípusok terén. Ez

összhangban van azzal a megfigyeléssel, mely szerint a depresszió kevésbé rontja az általános egészségi állapotot, ha csak önmagában áll fenn, mintha más krónikus betegséggel együtt, komorbiditásként jelentkezik (20).

7. Az akut és krónikus citalopram kezelés során észlelt elváltozások mennyire specifikusak erre a szerre, vagy más (típusú) antidepresszáns esetén is megfigyelhetők?

Általánosságban elmondható, hogy mind a mai napig nem állnak rendelkezésre olyan szisztematikus vizsgálatok, melyek a különböző hatásmechanizmusú antidepresszívumok agyi érzelmfeldolgozásra vagy szürkeállomány-sűrűsége kifejtett hatásait emberben hasonlították össze. Egészségesekben SSRI-k (pl. citalopram, escitalopram és fluvoxamin) akut vagy rövid távú (7-21 nap) adagolásban csökkentették a negatív/averzív ingerekre adott amygdalaaktivációt, hasonlóan saját eredményeinkhez, illetve más limbikus területek aktivációját. Ugyanakkor fontos leszögezni, hogy a látott agyi aktivációmintázat-változást nagymértékben befolyásolta az alkalmazott érzelmfeldolgozási feladat típusa. Jóval kevesebb adat áll rendelkezésre a szelektív noradrenalinfelvétel-gátló (SNRI) reboxetin hatásáról. Az eddigi eredmények alapján azonban feltételezhető, hogy míg az SSRI-k fő hatása a negatív/averzív ingerekre adott válasz csökkentése, addig a noradrenerg rendszeren ható készítmények esetén a pozitív/jutalmazó érzelmi információk feldolgozásának erősödése figyelhető meg (21). Ennek némileg ellent mond az a saját megfigyelésünk, hogy az akut citalopraminfúzió egészségesekben fokozta a boldog-semleges arcok nézése során az ACC és hippocampusz aktivációt is (22), arra utalva, hogy az akut szinaptikus szerotonin-szint-növekedés nem specifikus módon fokozza az érzelmfeldolgozást egészségesekben, pl. az arousal növelésén keresztül (23). Ez utóbbi lehetőséget támasztotta alá egy a Nemzeti Agykutatási Program keretében végzett, nemrég közzétett vizsgálatunk is (24). Depressziós betegek esetén a fő és leginkább megismételt megfigyelés, hogy az antidepresszívumkezelések normalizálják a depresszióra jellemző negatív érzelmfeldolgozási torzítást, vagyis a kórosan fokozott limbikus és amygdala aktivitást negatív/averzív ingerekre csökkentik (21), mely megfelel saját megfigyeléseinknek is. A különböző hatásmechanizmusú antidepresszívumok összehasonlítását azonban nehezíti a vizsgált betegek heterogenitása, az alkalmazott antidepresszívumok sokfélesége sokszor egy vizsgálaton belül is, a változó dózistartomány, és az alkalmazott feladatok/paradigmák sokfélesége (21). Az agyi strukturális vizsgálatok területén az eredmények szerteágazóak. A depresszió antidepresszívummal történő kezelése esetén 11 vizsgálatból pusztán 3 esetben közöltek hippocampusz szürkeállomány-növekedést, bár ennek ellenére is ez számít a legmegismételhetőbb eredménynek, és összhangban van az elektrokonvulzív terápia során tapasztalt kiterjedt szubkortikális szürkeállomány-növekedéssel, mely magába foglalja a hippocampusz-amygdala komplexumot, az ACC-t és a striátumot (25). Részletes, antidepresszívum-típusonkénti összehasonlításra sajnos itt sincs lehetőség a betegek és az alkalmazott kezelések heterogenitása miatt.

Ismételten köszönöm Klivényi Professzor Úr alapos munkáját és értékes kérdéseit, és tisztelettel kérem a bírálói véleményre adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2020. január 12.

Dr. Juhász Gabriella

A válaszban felhasznált irodalmak jegyzéke:

1. Dausset J et al., *Genomics* **6**, 575-7 (1990).
2. Moskvina V et al., *Hum Hered* **70**, 141-9 (2010).
3. Eszlari N et al., *Transl Psychiatry* **9**, 119 (2019).
4. Deakin JF et al., *Eur Neuropsychopharmacol* **21**, 1-2 (2011).
5. Juhasz G et al., *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**, 2019-27 (2009).
6. Lazary J et al., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **150B**, 1118-27 (2009).
7. Juhasz G et al., *Biological psychiatry* **69**, 762-71 (2011).
8. Lazary J et al., *Eur Neuropsychopharmacol* **21**, 63-70 (2011).
9. Pap D et al., *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* **159B**, 928-40 (2012).
10. Eszlari N et al., *Translational psychiatry* **6**, e745 (2016).
11. Gonda X et al., *Translational psychiatry* **6**, e945 (2016).
12. Juhasz G et al., *PloS one* **10**, e0116316 (2015).
13. Lesch KP et al., *Science* **274**, 1527-31 (1996).
14. Egan MF et al., *Cell* **112**, 257-69 (2003).
15. Chen J et al., *Am J Hum Genet* **75**, 807-21 (2004).
16. Zhang PW et al., *Mol Psychiatry* **9**, 916-31 (2004).
17. Delaneau O et al., *Science* **364**, (2019).
18. Marx P et al., *PLoS computational biology* **13**, e1005487 (2017).
19. Ligthart L et al., *Hum Genet* **133**, 173-86 (2014).
20. Moussavi S et al., *Lancet* **370**, 851-8 (2007).
21. Wessa M et al., *Curr Neuropharmacol* **13**, 466-79 (2015).
22. Anderson IM et al., *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* **21**, 140-8 (2011).
23. Pringle A et al., *Dialogues Clin Neurosci* **17**, 477-87 (2015).
24. Edes AE et al., *Neuropharmacology*, 107807 (2019).
25. Enneking V et al., *Psychol Med*, 1-23 (2019).