

# Polymerase-kettingreactie en psychiatrie

door A.H. Veeffkind en C.A. Moggré

Gepubliceerd in 1994, no. 5

## Samenvatting

**Een belangrijke doorbraak binnen de moleculaire biologie is de recente techniek: ‘polymerase chain reaction’ (PCR). Met deze techniek kan in relatief korte tijd een specifieke DNA-sequentie in grote hoeveelheid worden aangemaakt. Hiermee ontstaan nieuwe mogelijkheden op het gebied van medische laboratoriumdiagnostiek. In dit artikel wordt ingegaan op de techniek als zodanig en op toepassingen binnen de psychiatrie. De lijn van het eigen onderzoek wordt aangegeven.**

## Inleiding

De razendsnelle ontwikkelingen in de DNA-technologie kunnen haast niemand meer ontgaan zijn. Was het eerst de science fiction die slechts een select gezelschap informeerde, nu kissebissen de politici over het al of niet geoorloofd zijn van bewijsvoering met behulp van DNA-identificatie.

Een belangrijke techniek op dit gebied, de ‘polymerase chain reaction’ (PCR), werd in 1984 uitgevonden door Mullis, die er recent een gedeelde Nobelprijs voor ontving. De essentie van deze techniek is dat in korte tijd, dat wil zeggen enkele uren, in een reageerbuis miljoenen kopieën van een specifiek stukje DNA gemaakt kunnen worden.

Toepassingen liggen heel duidelijk op het gebied van de somatische diagnostiek en het fundamentele onderzoek. Echter, ook aan toepassingen in de psychiatrie kan gedacht worden, met name aan diagnostiek bij familiale aandoeningen en voorspellingen ten aanzien van potentiële farmacokinetische reactie op medicijnen.

## Natuur

Het DNA van elk organisme is opgebouwd uit twee nucleotidenstrengen die rond elkaar gedraaid zijn, de zogenaamde dubbele helix. Die nucleotiden onderscheiden zich van elkaar doordat ze één van de vier verschillende bouwstenen (Adenine, Thymine, Cytosine of Guanine) bevatten. De volgorde waarin die bouwstenen voorkomen is specifiek voor de erfelijke eigenschappen van een individu, net zoals in een tekst de lettervolgorde specifiek is voor die tekst. De beide strengen van het DNA zijn complementair. Dat wil zeggen: tegenover de ene bouwsteen zit altijd dezelfde andere, *T* tegenover *A* en *G* tegenover *C*. Waterstofbruggen houden de strengen bij elkaar.

In de natuur vermenigvuldigt DNA zich bij celdeling. De bedoeling is dat de DNA-samenstelling in de dochtercel precies dezelfde is als in de oorspronkelijke cel. Om dat te bereiken gaan de twee DNA-strengen uiteen en dienen afzonderlijk als matrijs voor de aanmaak van een nieuwe complementaire streng. Op deze manier worden twee nieuwe dubbelstrengen gevormd. Het enzym DNA-polymerase is onmisbaar bij dit syntheseproces.

## PCR-techniek

De PCR-techniek maakt gebruik van dit natuurlijke principe. Door voorzichtige verhitting (ca. 94° C) van DNA worden de waterstofbruggen verbroken en valt het DNA uiteen in twee losse strengen: de denaturatie. Bij lagere temperaturen kunnen twee enkelstrengs-DNA-moleculen weer recombineren tot een dubbelstreng, mits de strengen complementair zijn. Na de denaturatie van het DNA worden twee 'primers' toegevoegd, stukjes enkelstrengs-DNA-fragment die in het laboratorium zodanig gemaakt zijn dat ze passen op de uiteinden van het stuk DNA waarin we geïnteresseerd zijn. Bij een temperatuur van zo'n 50° C hechten deze primers op hun complementaire stukje DNA. Beginnend vanaf die plaats kan dan weer dubbelstrengs-DNA opgebouwd worden door complementair één voor één de juiste bouwsteen toe te voegen. Het enzym polymerase katalyseert deze synthese. Nu zijn twee nieuwe DNA-dubbelstrengen ontstaan, identiek aan het oorspronkelijke stuk dat als matrijs gediend heeft. Herhaling van dit proces (verwarmen/denaturatie - lagere temperatuur/primer - polymerase/bouwstenen) levert nieuwe strengen die zowel een gedefinieerd begin- als eindpunt hebben. Opnieuw denatureren, vasthechten van de primers en strengvorming, geeft een verdubbeling, etc. etc. Theoretisch heeft men na 20 cycli een miljoen kopieën van het DNA-fragment en na 30 cycli een miljard. In de praktijk valt dat wat lager uit.

Aanvankelijk moest na iedere cyclus nieuw polymerase-enzym worden toegevoegd omdat dit enzym bij de denaturatietemperatuur kapot ging. Intensief zoeken in heetwaterbronnen naar daarin levende bacteriën die voor hun natuurlijke processen meer hittebestendige enzymen nodig hebben, leverde een geschikter enzym. Het proces is hiermee veel minder bewerkelijk geworden.

## PCR en psychiatrie

De toepassingsmogelijkheden voor PCR zijn legio en waarschijnlijk nog niet eens allemaal bedacht. In dit artikel zal een overzicht worden gegeven van die aspecten ervan die voor de psychiatrie van belang zijn. Hierbij dient in overweging genomen te worden dat genetische afwijkingen niet direct vanaf de geboorte tot manifeste ziekteverschijnselen hoeven te leiden. Het kan ook dat deze pas later optreden omdat ze dan pas uitgelokt worden, of omdat ze (nog) voldoende gecompenseerd worden. Als in de psychiatrie genetische factoren een rol spelen, dan zal meestal aan deze categorie gedacht moeten worden.

*Alzheimer* - Alzheimer is een vorm van dementie die samengaat met een karakteristieke degeneratie van de zenuwcellen en ophoping van amyloïd eiwit in de hersenen. Op chromosoom 21 werd een gen ontdekt (Robakis e.a. 1987) dat codeert voor het eiwit waar uiteindelijk het opstapelende amyloïd uit ontstaat. Vooral de familiale vorm waarbij al voor het zestigste levensjaar symptomen optreden, werd hiermee in verband gebracht. Ook op chromosoom 14 werd een gebied gelokaliseerd dat een rol zou kunnen spelen.

Ten aanzien van de Alzheimer-vorm die op een hoge leeftijd ontstaat en die veel vaker voorkomt, is recent (Corder e.a. 1993) een gen op chromosoom 19 als risicofactor aangewezen. De onderzoekers lieten in hun populatie zien dat van de mensen die homozygoot een bepaalde variant van dat gen bezaten, 90% op 75-jarige leeftijd Alzheimer hadden, tegen 20% normaal. Een boeiende bijkomstigheid is dat het betrokken gen codeert voor apolipo-proteïne E, een cholesterol transporterend eiwit, bekend uit onderzoek rond hart- en vaatziekten.

De toepasbaarheid van deze kennis schuilt hierin dat detectie van het alleel, met behulp van PCR, diagnostische ondersteuning kan geven. Verder fundamenteel onderzoek naar de onderliggende processen zal moeten uitmaken of hiermee ook de weg naar preventieve therapieën geopend is.

*Stemmingsstoornissen en schizofrenie* - Tweelingstudies, adoptiestudies en relatieve risicostudies onder verwanten van psychiatrische patiënten duiden erop dat zowel bij stemmingsstoornissen (o.a. Mendlewicz 1992) als bij schizofrenie (o.a. Varma 1993) een genetische component een rol speelt. Het onderzoek bevindt zich nog in het beginstadium. Aanwijzing van een verantwoordelijk DNA-gebied (stemmingsstoornissen: Egeland e.a. 1987; schizofrenie: Gorwood e.a. 1992 en Amato e.a. 1992) is door de eigen werkgroep of door anderen weer ontkend (stemmingsstoornissen: Kelsoe e.a. 1989; schizofrenie: Asheron e.a. 1992). De leringen die hieruit getrokken zijn, hebben de onderzoeksstrategieën aanzienlijk doen rijpen en een sterkere rem gezet op premature claims (Gilliam 1992). Het is duidelijk dat deze complexe ziekten, als resultanten van gecombineerde effecten van meerdere genen en van omgevingsfactoren, moeilijker benaderbaar zijn dan de ziekten gebaseerd op een enkele genafwijking. Optimistische geluiden hebben dan ook direct waarschuwend artikelen opgeleverd om de invloed van de genetische factoren niet te overschatten (Reiss e.a. 1991; Torrey 1992). Vruchtbaarder lijkt de benadering om het biopsychosociale model te blijven hanteren. Verbetering aan de ene pijler, in dit geval de biologische, kan mede gebruikt worden om ook de andere te verstevigen (Baron 1991).

*Alcohol- en drugverslaving* - Ook bij verslaving aan alcohol en drugs zijn er studies die de visie ondersteunen dat zowel omgevingsfactoren als genetische factoren een rol spelen bij het ontstaan. Onderzoek is gaande of er een dopamine-2 receptor alleel is dat predisponeert voor de afhankelijkheid (Uhl e.a. 1992): een gebied met nog veel niet-gereproduceerde gegevens (Persico e.a. 1993; Barr en Kidd 1993). Toch is ook hier een goed toegankelijk 'zijlijntje' ontdekt. Bij alcoholisme heeft men zich de vraag gesteld of de genetische verschillen niet zouden kunnen schuilen in alcoholafbrekende enzymen, de alcoholdehydrogenase. Het voorkomen van een inactieve vorm van dit enzym betekent dat acetaldehyde zich ophoopt en tot onaangename symptomen na het drinken van alcohol leidt. Het homozygoot hebben van het alleel dat de aanmaak van de inactieve vorm bepaalt, biedt een genetische bescherming tegen alcoholisme. Op zich niet verbazingwekkend; de 'therapeutische werking' van disulfiram is hierop gebaseerd. Toch is dit een praktische invalshoek waarbij PCR uitstekende diensten verleent voor verder onderzoek (Gilder e.a. 1993; Tu en Israel 1993).

*Genetisch bepaald geneesmiddelen-metabolisme* - Veel van de in de psychiatrie gebruikte lipofiele geneesmiddelen worden in de lever gemetaboliseerd door oxydatieve reacties. Deze omzettingen worden gekatalyseerd door iso-enzymen met de prozaïsche naam: P450IID6. De ene mens heeft echter een veel grotere capaciteit tot geneesmiddelenomzetting dan de andere. Sterker nog, belastingsproeven met testdrugs hebben laten zien dat 5-10% van het Kaukasische ras nauwelijks tot die omzetting in staat is. Het gevolg voor deze groep is dat zij bijwerkingen ontwikkelen bij overigens normale doses aan tricyclische antidepressiva, fluoxetine, paroxetine of sommige antipsychotica, waarschijnlijk ten gevolge van te hoge concentraties van het medicament (Veefkind e.a. 1993). De oorzaak van dit trage metabolisme schuilt in de afwezigheid van het P450IID6. Deze afwezigheid op haar beurt is weer te verklaren uit het feit dat door een of meerdere mutaties op het coderende alleel, CYP2D6 op chromosoom 22, het betrokken iso-enzym niet aangemaakt kan worden. Onder anderen Heim en Meyer (1990) hebben een weg aangegeven waarop met behulp van PCR deze mutaties kunnen worden opgespoord. Gesubsidieerd door de 'Open Ankh' zijn wij bezig te onderzoeken of deze methode ook voor 'Zon en Schild' bruikbare resultaten geeft. Soortgelijk onderzoek is gaande in APZ 'Veldwijk'. In een gemeenschappelijke vervolgstudie wordt de klinische relevantie onderzocht. Het belang is hierin gelegen dat met een niet-belastende methode vooraf bepaald kan worden of een patiënt tot de trage metaboliseerders behoort. Een terughoudend doseringsbeleid kan dan leed besparen.

Een recente publikatie (Bertilsson e.a. 1993) geeft aan dat volgens soortgelijke technieken mogelijk ook een groep snelle metaboliseerders is te identificeren. Dus die patiënten die na een doorgaans normale dosis nog nauwelijks een spiegel opbouwen. Is een patiënt eenmaal als snelle metaboliseerder getypeerd, dan kan een hoge dosis voorgeschreven worden en vervalt de niet zelden gerezen

verdenking van therapieontrouw.

Gecombineerd zouden beide gegevens een krachtig hulpmiddel bij toepassing van farmacotherapie leveren. Bovendien kunnen de heterozygote vormen, waarbij het voor de trage of snelle metabolisering verantwoordelijke gen maar voor de helft aanwezig is, ook een intermediaire betekenis hebben, zij het dat daar overlap met 'normale' gebieden gaat optreden. Op researchgebied kan een duidelijke verbetering geboekt worden rond de 'dose-finding'-studies.

### **Conclusie**

Tot nu toe is de koppeling tussen genetische afwijkingen en psychiatrische aandoeningen nog niet erg succesvol geweest. Mogelijk door een onjuiste benadering van de problematiek.

Met de PCR is een techniek ontdekt die de snelheid van moleculair- genetisch onderzoek enorm verhoogt. Dit betekent dat in de komende tijd allerhande gegevens veel sneller aangedragen en ook gecontroleerd kunnen worden.

De directe vruchten die de psychiatrie van deze techniek kan plukken, liggen op het gebied van de enkele 'Mendeliaanse' mutaties. Voorspellende gegevens rond geneesmiddelen-metabolisme lijken heel praktisch bruikbaar voor dagelijkse behandeling en voor verbetering van onderzoeksopzet. Voor koppeling van het voorkomen van symptomen aan het voorkomen van genetische mutaties moeten de resultaten van onderzoekscentra afgewacht worden. Toetsing op bruikbaarheid en eventuele implementatie kan dan snel plaatsvinden in psychiatrische ziekenhuizen die daarvoor zijn toegerust.

**De auteurs zijn dr. J. van der Weide van het Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk te Ermelo erkentelijk voor het kritisch doorlezen van het manuscript.**

### **Literatuur**

**D'Amato, T., D. Campion e.a. (1992), Evidence for a pseudo autosomal locus for schizophrenia II. *British Journal of Psychiatry***

161, 59-62.

Asherson, P., E. Parfitt e.a. (1992), No evidence for a pseudo autosomal locus for schizophrenia. *British Journal of Psychiatry* 161, 63-68.

Baron, M. (1991), Genes, environment and psychopathology. *Biological Psychiatry* 29, 1055-1057.

Barr, C.L., en K.K. Kidd (1993), Population frequencies of the A1 allele at the dopamine D2 receptor locus. *Biological Psychiatry* 34, 204-209.

Bertilsson, L., M.L. Dahl e.a. (1993), Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet* 341, 63.

Corder, E.H., A.M. Saunders e.a. (1993), Gene dose of apolipoprotein E type allele and the risk of Alzheimer disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.

Egeland, J., D.S. Gerhard e.a. (1987), Bipolar affective disorders linked to DNA markers on chromosome 11. *Nature* 325, 783-787.

Gilder, F.J., S. Hodgkinson e.a. (1993), ADH and ALDH genotype profiles in Caucasians with alcohol-related problems and controls. *Addiction* 88, 383-388.

Gilliam, T.C. (1992), Mapping psychiatric disease genes: impact of new molecular strategies. *Journal of Psychiatric Research* 26, 309-326.

Gorwood, P., M. Leboyer e.a. (1992), Evidence for a pseudo autosomal locus for schizophrenia I. *British Journal of Psychiatry* 161, 55-58.

Heim, M., en U.A. Meyer (1990), Genotyping of poor metabolizers of debrisoquine by allele-specific amplification. *Lancet* 336, 529-532.

Kelsoe, J.R., E.I. Gings e.a. (1989), Reevaluation of the linkage relationship between chromosome 11 p loci and the gene for bipolar affective disorder in the Old Order Amish. *Nature* 342, 238-243.

Mendlewicz, J. (1992), New molecular genetic studies in the affective disorders. *Pharmacopsychiatry* 25, 29-32.

Persico, A.M., D.J. Vandenberg e.a. (1993), Dopamine transporter gene polymorphisms are not associated with polysubstance abuse. *Biological Psychiatry* 34, 265- 267.

Reiss, D., R. Plomin e.a. (1991), Genetics and psychiatry: an unheralded window on the environment. *American Journal of Psychiatry* 148, 283-291.

Robakis, N.K., H.M. Wisniewski e.a. (1987), Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* i, 384- 385.

Torrey, E.F. (1992), Are we overestimating the genetic contribution to schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin* 18, 159-170.

Tu, G.-c., en Y. Israel (1993), A new approach for the rapid detection of common and atypical aldehyde dehydrogenase alleles. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31, 591-594.

Uhl, G.R., A.M. Persico e.a. (1992), Current excitement with D2 dopamine receptor gene alleles in substance abuse. *Archives Gen. Psychiatry* 49, 157-160.

Varma, S.L., en I. Sharma (1993), Psychiatric morbidity in the first-degree relatives of schizophrenic patients. *British Journal of Psychiatry* 162, 672-678.

Veefkind, A.H., J.C.L. van Commenee e.a. (1993), Serumspiegels van psychofarmaca. Spiegelbeeld wat vertel je me nou? *Tijdschrift voor Psychiatrie* 35, 242-253.

### **Summary: Polymerase chain reaction and psychiatry**

**An important breakthrough in molecular biology is the recently discovered technique of the ‘polymerase chain reaction’ (PCR). By means of this technique strands of DNA can be copied in a relatively short time, producing a substantial amount of detectable material. This generates new possibilities for medical laboratory diagnoses. In this article the technical background, the impact on application in psychiatry, and our own line of research, are outlined.**

De auteurs zijn respectievelijk als klinisch chemicus en als onderzoeksanaliste werkzaam in Psychiatrisch Centrum 'Zon en Schild' te Amersfoort, Postbus 3051, 3800 DB Amersfoort.

Het artikel werd voor publikatie geaccepteerd op 4-2-1994.