

Submikroskopiske kromosomanomalier som årsag til skizofreni

Forskningsassistent Thomas Hansen,
forskningsassistent Andrés Ingason &
forskningschef Thomas Werge

Psykiatrisk Center Sct. Hans,
Forskningsinstitut for Biologisk Psykiatri

Nature offentliggjorde tidligere i år to artikler af et stort europæisk konsortium, som forfatterne er del af, og af et lignende amerikansk konsortium, der viser, at skizofreni kan forårsages af sporadiske og transmitterede submikroskopiske deletioner

på kromosom 1 og 15 [1, 2]. Fundene kommer i ethundrede-året for *Eugene Bleulers* første anvendelse af begrebet skizofreni og udgør det første formelle bidrag til afdækningen af de genetiske årsager til lidelsen, der har en heritabilitet på 70-80%.

Skizofreniens genetiske paradoks

Skizofreni har en livstidsrisiko på ca. 1% og forekommer sporadisk og familiært i alle samfund og kulturer [3]. Sygdommen er forbundet med en nedsat reproduktionsrate - ikke mindst blandt mænd [4] - hvilket betyder, at de genetiske risikofaktorer for skizofreni er genstand for negativ selektion. Dette for-

Forkortelser og ordforklaringer

CNV

Copy number variants er en samlet betegnelse for submikroskopiske deletioner og duplikationer i genomet.

De novo

En de novo-mutation er opstået hos afkommet og findes dermed ikke hos forældrene (se Figur 2).

FISH

Fluorescence in situ hybridization er en kromosomundersøgelse, der kan påvise eksistens og placering af en given kromosomal region ved hjælp af fluoriserende prober (kendte DNA-sekvenser).

Genom

En organismes komplette genetiske materiale.

Genom-scan

Betegnelse for en genetisk analyse, der undersøger hele genomet for et højt antal kendte SNP'er (se nedenfor), typisk mellem 300.000 og en million SNP'er.

Heritabilitet

I genetisk sammenhæng bruges begrebet (H^2) til at beskrive den del af en fænotypes variation, som kan tilskrives genetisk variation. Høj heritabilitet ses typisk som en stor forskel i koncordans mellem mono- og dizygote tvillinger.

Karyotyping

Analyse af kromosomer i den kondenserede metafase, hvor større kromosomale deletioner eller duplikationer kan observeres i mikroskop.

Knockout

Et knockout-dyr er et genetisk modificeret dyr, hvor et gen eller en kromosomal region er blevet fjernet.

NAHR

Non-allelic-homologous-recombination: Normal overkrydsning

mellem homologe kromosomer finder sted under meiosen (dannelsen af kønsceller - reduktionsdeling) og sikrer, at de paternelle og materielle genomer »blandes«. I de områder af kromosomerne, der indeholder »segmentale duplikationer« (se nedenfor) kan der ske en skæv overkrydsning, som medfører, at området mellem de segmentale duplikationer mistes på det ene kromosom og samtidig duplikeres på det andet (se Figur 1).

Segmental duplikation

Betegnelse for en region i genomet (> 1.000 nukleotider, dvs. 1 kb), der er duplikeret, og hvor de dupliserede regioner er mere end 90% identiske sekvenser. Hyppigheden af segmentale duplikationer varierer stærkt mellem kromosomer og anslås at udgøre ca. 4% af det menneskelige genom.

Selektion

Negativ selektion udspringer af *Darwins* teori om *survival of the fittest*, hvor individer med en mindre gunstig fænotype (f.eks. sygdom) har lavere sandsynlighed for at overleve og videregive deres arvemasse frem for individer med en mere gunstig fænotype.

SNP

Single nucleotide polymorphism er en betegnelse for variation af et enkelt nukleotid i det menneskelige genom. Enkeltnukleotidvariationer, der forekommer med en frekvens på under 3%, betegnes almindeligvis som mutationer.

Sporadisk/familiær

Sporadisk sygdom forekommer i familier, hvor den givne sygdom ikke ellers er kendt. Kan også betegne sygdomstilfælde hvor ingen af patientens forældre er ramt af sygdommen.

Transgen

En organisme hvor et gen eller en kromosomal region er blevet indsat.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

hold kan umiddelbart forekomme uforeneligt med lidelsens høje heritabilitet, idet det kan undre, hvilke faktorer der i givet fald nedarves, hvis de disponerende genvarianter de facto elimineres fra populationen som følge af den nedsatte reproduktionsrate. Der er gjort mange forsøg på at forklare dette

Faktaboks

Fund

Tre submikroskopiske de novo-deletioner (CNV'er) på kromosom 1 og 15 er associeret med høj risiko for skizofreni [1].

Studiedesign

De novo-kromosomanomalier blev identificeret i en *discovery-sample* og derefter undersøgt for association til skizofreni i en totrians procedure i uafhængige patient-kontrolstikprøver.

Sample

Patienter og kontroller kom fra forskningscentre i otte europæiske lande, bl.a. Dansk Psykiatrisk Biobank på Sct. Hans. *Discovery-samplen* bestod af 2.160 trioer og 5.558 duer (forælder-barn) uden patienter med skizofreni. De uafhængige patient-kontrol-sampler bestod af i alt 4.718 patienter og 41.201 kontroller.

Mekanisme

CNV'erne opstår spontant under gametdannelse hos forældrene som følge af rekombinationsfejl (via NAHR) i ustabile regioner af genomet. De novo-dannelse af højrisiko-CNV'er for skizofreni kan forklare, at skizofreni har en høj heritabilitet og samtidig er genstand for negativ selektion som følge af nedsat reproduktionsrate blandt patienter.

Betydning

Mutationer med høj risiko for skizofreni muliggør genetisk assisteret diagnostik i klinisk psykiatri og udvikling af dyremodeller til studier af patologiske mekanismer og nye farmakologiske behandlingsprincipper. De identificerede CNV'er er tidligere blevet identificeret hos personer med autisme, mental retardering og lignende udviklingsforstyrrelser, og de går dermed på tværs af etablerede diagnostiske grænser.

Begrænsninger

Studiet tager udgangspunkt i de novo-CNV'er i en *discovery-sample* uden patienter med skizofreni, hvilket betyder, at mutationer, der er forbundet med meget høj risiko for skizofreni, ikke vil blive identificeret. Denne *discovery-sample* blev indsamlet blandt den homogene og relativt isolerede islandske befolkning, og vil derfor næppe tillade identificering af alle de novo-CNV'er, der medfører høj risiko for skizofreni.

Parallele fund

En anden forskergruppe fandt, at de samme deletioner var forbundet med skizofreni i en uafhængig, multinational *sample*. Deres fund er offentliggjort i samme udgave af Nature [2].

tilsyneladende paradoks, der tillige gælder for autisme og mental retardering. En mulig forklaring er, at de sygdomsdisponerende genvarianter samtidigt medfører evolutionære fordele og dermed er under en kompenserende positiv selektion i den øvrige befolkning (fænomenet betegnes balanceret selektion). En markant version af hypotesen om kompenserende positiv selektion af sygdomsdisponerende genvarianter beskriver skizofreni som prisen mennesket betaler for sprog. Denne hypotese om balanceret selektion bygger på, at den særegne cerebrale asymmetri hos mennesket er ændret hos patienter med skizofreni og tillige antages at være en evolutionær forudsætning bl.a. for vores evne til at beherske et avanceret sprog og dermed for den menneskelige udvikling [5, 6]. Balanceret selektion kan imidlertid også finde sted via en simplere mekanisme, hvor sygdomsdisponerende og fordelagtige genvarianter er lokaliseret tæt på hinanden på kromosomet og således hyppigt nedarves sammen; varianterne siges at være i koblingsuligevægt.

Det ustabile genom

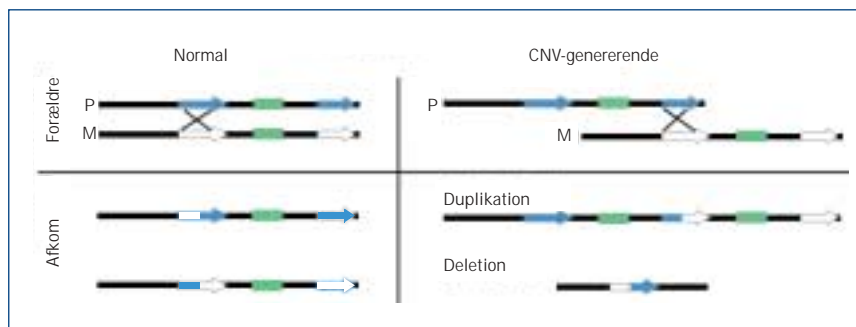
En alternativ hypotese er, at den negative selektion de facto medfører en konstant eliminering af de genetiske risikofaktorer fra befolkningen, men at de selvsamme disponerende genvarianter genopstår de novo som følge af et ustabilt genom. Flere studier har for nylig dokumenteret, at kromosomal ustabilitet er et udbredt fænomen i det humane genom, og at der – udover de traditionelle, relativt store anomalier, som påvises ved karyotypning og *fluorescence in situ hybridization* (FISH) – findes et stort antal submikroskopiske deletioner og duplikationer (betegnet *copy number variants*, CNV) med en estimeret hyppighed over en pr. menneske [7]. Estimatet medregner ikke kendte variationer i vævstypeantigen- eller immunglobulinkomplekserne eller kendte segmentale duplikationer. Hver enkelt CNV er forholdsvis sjældent – typisk med en frekvens under 1% i befolkningen – hvilket gør det svært at etablere formelt, statistisk bevis for association til sygdom. De første studier af CNV'ers betydning for skizofreni har således været begrænset til at undersøge, om CNV'er samlet set opstår (de novo) eller forekommer hyppigere blandt patienter end blandt raske kontroller. To studier af hhv. en trio-*sample* (dvs. far, mor og barn; n = 152/159) og en traditionel case-kontrol-*sample* (n = 150/268) [7, 8], samt vores eget endnu upublicerede studie af en trio-*sample* (n = 132/549) synes at bekræfte denne hypotese.

Submikroskopiske deletioner

Det europæiske konsortium, som forfatterne er del af, har forsøgt at identificere kausale eller højrisiko de novo-CNV'er for skizofreni [1]. Først gennemførte vi en genomskanning af en *sample* med 2.160 trioer og 5.558 forældre-barn-par (svarende til 9.878 meioser) uden patienter med skizofreni, og vi identificerede 66 forskellige CNV'er, der var fordelt på 51 deletioner og 15 duplikationer. Dernæst undersøgte vi forekomsten af de

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Figur 1. Kromosomal overkrydsning. Under den meiotiske celledeling ved dannelsen af (forældrenes) kønsceller sker der overkrydsning mellem ækvivalente regioner på homologe kromosomer. Imidlertid kan der også ske ikkeækvivalent overkrydsning, f.eks. mellem ikkeækvivalente segmentale duplikationer, hvorved der opstår hhv. en deletion og en duplikation, dvs. en *copy number variant (CNV)*. Sort streg: kromosom. Blå og hvid pil: segmentale duplikationer. P: Paternelt kromosom. M: Maternelt kromosom. Grøn boks: Gen. Krydsede streger: homolog overkrydsning.

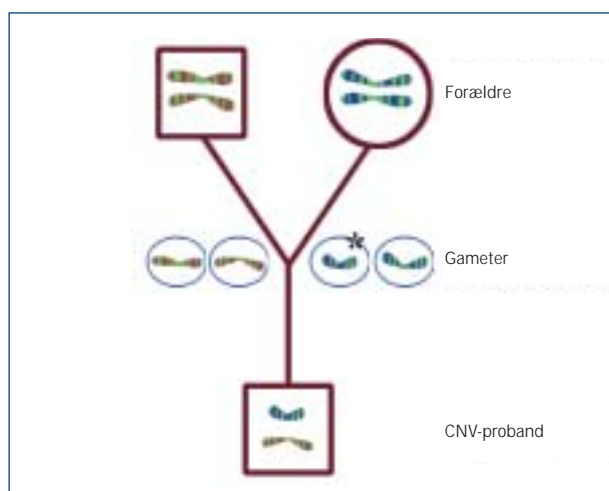


66 CNV'er i en case-kontrol-*sample* på 4.718 patienter og 41.201 kontroller og fandt, at tre deletioner på hhv. kromosom 1q21.1, 15q11.2 og 15q13.3 medfører høj risiko for skizofreni ($p = 2,9 \cdot 10^{-5}$, oddsratio (OR) = 14,83; $p = 6,0 \cdot 10^{-4}$, OR = 2,73; $p = 5,310^{-4}$, OR = 11,54). Et uafhængigt studie fra et amerikansk konsortium finder også, at to ud af de tre CNV'er er associeret med skizofreni ved anvendelse af en alternativ metodik [2], hvilket øger begge studiers troværdighed.

De tre CNV'er er tidligere observeret hos patienter med autismespektrumlidelser [1] og et studie, som er offentliggjort i september måneds udgave af *New England Journal of Medicine*, finder tillige, at deletionen på kromosom 1 er signifikant associeret med mental retardering og andre udviklingsforstyrrelser. Forfatterne anbefaler, at den pågældende CNV anvendes som diagnostisk markør [9]. Disse fund tyder på et kausalt overlap for de tre hjernelidelser og dermed eksistensen af mikro-deletionssyndromer, der går på tværs af ellers etablerede diagnostiske kategorier.

Tidligere studier tyder på, at de tre påviste CNV'er ikke er enkeltstående tilfælde, men et udbredt fænomen. Således er deletioner på kromosom 22q11, der kan forårsage velo-kardio-facialt-syndrom (VCFS), som bl.a. er karakteriseret ved læbe-gane-spalte, hjertemisdannelser og dysmorfe ansigts-træk, gennem de seneste år blevet forbundet med høj risiko (>20%) for skizofreni eller andre psykotiske tilstande i voksenalderen svarende til 2% af samtlige tilfælde af skizofreni [10]. Vores og det parallelle amerikanske studie bekræfter, at også 22q11 findes hyppigere blandt personer med skizofreni end blandt kontroller, omend frekvensen er 5-10 gange lavere end tidligere rapporteret (henholdsvis 0,2% og 0,4%).

CNV'erne rammer adskillige gener, og det er endnu uklart hvilke gener, der i givet fald er funktionelt koblet til skizofreni. De tre identificerede CNV'er synes at være opstået ved *non-allelic-homologous-recombinations* (NAHR, **Figur 1**) som konsekvens af den grundlæggende genomiske ustabilitet, der følger af segmentale duplikationer, som flankerer de pågældende kromosomale regioner. I den udstrækning, at CNV'er dannes som følge af NAHR i genomet, vil maternelle de novo-CNV'er være opstået i moderens fostertilstand svarende til mormoderens graviditet, hvor meiotisk celledeling fører til gametdannelse (**Figur 2**). Således kunne ikkegenetiske



Figur 2. *Copy number variant (CNV)*-oprindelse ved *non-allelic-homologous-recombination*. Nydannelse af CNV som følge af *non-allelic-homologous-recombination* udspringer af meiosen, der fører til gametdannelse. Maternelt vil dette ske i fostertilstanden, mens det paternelt er en løbende proces, der begynder efter kønsmødningen. Hvis en gamet, der indeholder en nyopstået CNV, føres videre til befrugtning, kaldes CNV'en de novo hos afkommet, selvom den de facto er opstået i forælderen. Kromosomer er sribede cylindre, røde/grønne og blå/grønne på hhv. de maternelle og paternelle kromosomer. *) CNV-bærende gamet.

risikofaktorer have udøvet deres effekt en generation tidligere end hidtil antaget.

De to studier identificerer tre uafhængige CNV'er, der er forbundet med høj sygdomsrisiko og antyder dermed, at skizofreni dækker over forskellige syndromer, hvoraf nogle vil forekomme med lav hyppighed afhængigt af frekvensen af de identificerede CNV'er. Det er vores forventning, at vores CNV-data på mere end 40.000 individer vil give mulighed for at forklare mere end 10% af forekomsten af skizofreni. Igangværende undersøgelser, der er baseret på andre befolkningsgrupper og selekterede patientgrupper, forventes at føre til identificering af yderligere kausale eller højrisiko-CNV'er.

Implikationer af de genetiske fund

Vores fund støtter hypotesen om, at genetiske varianter med høj risiko for skizofreni opstår spontant og typisk transmitteres i nogle få generationer for derefter at »uddø« som følge af den nedsatte reproduktionsrate blandt patienterne. I henhold

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

til en sådan model vil CNV'er med høj penetrans og svær sygdomsmanifestation hurtigere blive elimineret, mens klinisk mindre alvorlige varianter vil videreføres gennem flere generationer. En sådan genetisk model for skizofreni vil kunne forklare forekomst af både sporadiske og familiære tilfælde af sygdommen og i begrænset udstrækning også diskordans mellem monozygote tvillinger. En konceptuel konsekvens af denne sygdomsmodel er, at de arvelige faktorer ved skizofreni ikke udelukkende er egentlige kausale genvarianter, men også selve den genomiske ustabilitet. Det bliver interessant at afklare, om nogle CNV'er gør bærerne af disse særligt følsomme for ikkegenetiske risikofaktorer for skizofreni, eller om disse risikofaktorer kan påvirke de novo-frekvensen af CNV'er.

Identifikation af submikroskopiske deletioner blandt patienter med skizofreni må antages at få klinisk og videnskabelig betydning. Fundene giver umiddelbart anledning til overvejelser om genetisk baseret eller assisteret diagnostik, omend CNV'ernes specificitet mht. klinisk manifestation, prognose eller terapeutisk respons endnu ikke er afklaret. Inden for børne- og ungdomspsykiatri vil identificering af individer med høj risiko for at udvikle skizofreni kunne lette og målrette studier af profylaktiske tiltag og tidlig intervention samt danne baggrund for struktureret genetisk rådgivning på klinisk indikation.

Patogenesisen og -fysiologien ved skizofreni er i al væsentlighed ukendt og har således ikke dannet udgangspunkt for de nuværende behandlingstilbud. Påvisning af mutationer, der indebærer høj risiko for at udvikle en svær sindslidelse, giver en enestående mulighed for at identificere, hvilke neurobiologiske processer der er påvirket ved sygdommen. Skizofreni har ofte været fremstillet som en rent menneskelig lidelse, da de psykopatologiske forstyrrelser i menneskelig kognition ikke kunne genskabes i dyremodeller. Et spændende perspektiv ved de identificerede CNV'er er muligheden for at lave transgene eller knock-out-dyr, der bærer de tilsvarende deletioner af de identificerede regioner eller af et enkelt gen. Sådanne tiltag vil for første gang åbne mulighed for udvikling af farmakologisk, terapeutisk behandling eller profylakse, der er baseret på biologisk indsigt i de underliggende patologiske processer ved sygdommen. Indsigt i disse processer vil antageligt danne baggrund for udvikling af biologiske markører til monitorering af sygdomsprogression og behandlingseffektivitet.

Det er tillige vores håb, at identifikationen af submikroskopiske kromosomanomalier blandt patienter med skizofreni vil medvirke til at udbrede opfattelsen i befolkningen af skizofreni som en biologisk funderet hjernelidelse.

Korrespondance: *Thomas Werge*, Forskningsinstitut for Biologisk Psykiatri, Psykiatrisk Center Sct. Hans, DK-4000 Roskilde.
E-mail: thomas.werge@shh.regionh.dk

Antaget: 9. oktober 2008
Interessekonflikter: Ingen

Taksigelse: Det beskrevne arbejde samt den igangværende opfølgende forskning er finansieret gennem bevillinger fra Psykiatrisk Grundforskningsfond og fra den Europæiske Kommission; LSHM-CT-2006-037761 (SGENE) og PIAP-GA-2008-218251 (PsychGene).

Litteratur

1. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 2008;455:232-6.
2. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 2008;455:237-41.
3. Saha S, Chant D, Welham J et al. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Medicine* 2005;2:e141.
4. Nimgaonkar VL. Reduced fertility in schizophrenia: here to stay? *Acta Psychiatrica Scand* 1998;98:348-53.
5. Crow TJ. Is schizophrenia the price that homo sapiens pays for language? *Schizophr Res* 1997;28:127-41.
6. Huxley J, Mayr E, Osmond H et al. Schizophrenia as a genetic morphism. *Nature* 1964;204:220-1.
7. Xu B, Roos JL, Levy S et al. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 2008;40:880-5.
8. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 2008;320:539-43.
9. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C et al. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 2008, 10. september (Epub ahead of print).
10. Hoogendoorn ML, Vorstman JA, Jalali GR et al. Prevalence of 22q11.2 deletions in 311 Dutch patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;98:84-8.

Lægemedelstyrelsen

Tilskud til lægemidler

Lægemedelstyrelsen meddeler, at der pr. 3. november 2008 ydes generelt tilskud efter sundhedslovens § 144 til følgende lægemidler:

(J-01-CR-02) Amoxicillin/clavulansyre »Actavis«
tabletter*, Actavis A/S
(N-06-AB-10) Cipralextabletter*, 2care4 ApS
(C-09-DA-01) Cozaar Comp tabletter*, Orifarm A/S
(C-03-BA-11) Indapamid »Orifarm« depottabletter*,
Orifarm Generics A/S
(C-03-BA-11) Indapamid »Stada« depottabletter*,
PharmaCoDane ApS
(G-04-BD-09) Uraplex tabletter*, 2care4 ApS

gruppe uden klausulering over for bestemte sygdomme.

Denne bestemmelse trådte i kraft den 3. november 2008.

*) Omfattet af tilskudsprissystemet.