МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

РЪКОВОДИТЕЛ: ЧЛ. КОР. ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДМ, ДБН

БЛАГА БОРИСОВА РУКОВА

ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА МЕТИЛАЦИОННИ ПРОФИЛИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ШИЗОФРЕНИЯ

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен "ДОКТОР"

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика"

Шифър 4.3.

Професионално направление: „Биологически науки"

Научна специалност: „Генетика"

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: Чл. кор. проф. Д-р Драга Тончева, дбн

София, 2015г.

Благодаря сърдечно:

- на научния си ръководител чл. кор. проф. д-р Драга Тончева за предоставените възможности за работа със най-съвременни молекулярно-биологични техники, помощта в изработването, написването и оформянето на настоящия дисертационен труд. Изказвам благодарност;
- на проф. д-р Вихра Миланова за помощта при набирането на биологичен материал и клинични данни от пациентите с шизофрения;
- на доц. д-р Савина Хаджидекова за споделения опит и ценните съвети;
- на д-р Рада Станева и Зора Хамуде за помощта при изработването на дисертационния труд;
- на колегите от Институтът по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН и Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - София за съдействието при изработването на дисертационния труд;
- на семейството ми за постоянната подкрепа и разбиране.

Съдържание

I. Въведение ... 1

II. Литературен обзор ... 3

1. История на заболяването ... 3

2. Епидемиология на шизофренията ... 3

3. Симптоми ... 4

4. Лечение ... 5

5. Етиология на шизофренията ... 7

5.1 Външни фактори ... 7

5.1.1. Инфекции и имунна система ... 8

5.1.2. Усложнения при бременността и раждането ... 9

5.1.3. Сезон на раждане ... 9

5.1.4. Възраст на родителите ... 10

5.1.5. Пол и семейно положение ... 10

5.1.6. Автоимунни заболявания ... 10

5.1.7. Злоупотреба с канабис ... 11

5.1.8. Урбанизация ... 11

5.1.9. Семейни и социално-икономически предпоставки ... 12

5.1.10. Етническа принадлежност и расизъм ... 12

5.2. Патогенетични хипотези за шизофрения ... 14

5.2.1. Хипотези, свързани с нарушения в невротрансмисията ... 14

5.2.1.1. Допаминергична хипотеза ... 14

5.2.1.2. Глутаматергична хипотеза ... 15

5.2.1.3. ГАМК-ергична хипотеза ... 16

5.2.2. Хипотеза, свързана с развитието на нервната система ... 16

5.2.3. Имунологична хипотеза ... 17

5.2.4. Епигенетична хипотеза ... 18

6. Генетична предразположеност ... 18

6.1. Тип на унаследяване при шизофрения ... 18

6.2. Фамилни, близначни и адоптивни проучвания ... 20

6.2.1. Фамилни проучвания ... 21

6.2.2. Близначни проучвания ... 22

6.2.3. Адоптивни проучвания (проучвания на осиновени деца) ... 23

6.3. Методични подходи за идентифициране на генетичните основи на шизофренията 24
6.3.1. Анализи за скаченост ... 25
6.3.2. Асоциативните проучвания ... 26
6.3.3. Цялостни-геномни асоциативни проучвания ... 28
6.3.4. Цитогенетичен анализ на хромозомни аберации ... 30
7. Епигенетика ... 33
7.1. Молекулярни сигнали в епигенетичната регулация ... 39
7.1.1. Основни епигенетични регулаторни механизми ... 39
7.1.2. Транскрипционна регулация ... 40
7.1.3. Епигенетични характеристики на ДНК метилирането ... 40
7.1.4. ДНК метилационни сигнали ... 42
7.1.5. ДНК метилационен анализ ... 42
7.1.6. Регулаторни фактори при метилирането на ДНК – ДНК метилтрансферази ... 43
7.2. Метилационно профилиране на заболявания ... 45
7.2.1. Модификации в ДНК метилационния профил при стареене ... 45
7.2.2. Модификации в ДНК метилационния профил при рак ... 45
7.2.3. Модификации в ДНК метилационния профил при заболявания, свързани с развитие на нервната система ... 48
7.2.4. Модификации в ДНК метилационния профил при невродегенеративни и неврологични заболявания ... 49
7.2.5. Модификации в ДНК метилационния профил при автоимунни, сърдечно-съдови и др. заболявания ... 50
7.2.6. Модификации в ДНК метилационния профил при заболявания, свързани с нарушения в импринтинга ... 51
7.2.7. Модификации в ДНК метилационния профил при психиатрични заболявания 52
8. Диференциална сканираща калориметрия в диагностиката ... 55
8.1. Принос на плазмените белтъци към ДСК термограмата ... 56
III. Цел и задачи ... 59
IV. Материали и методи ... 60
1. Изолиране на високомолекулна ДНК ... 63
2. Изготвяне на сборни ДНК проби (пулове) ... 66
3. Микрочипов анализ на имунопреципитирана метилирана ДНК ... 67
4. Валидиране на метода на метилационния микрочипов анализ. ... 93
5. Протеомен анализ ... 103

V. Резултати 107
1. Цялостно геномно метилационно профилиране при пациенти с шизофрения, сравнени със здрави контроли 107
2. Разлики в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола .. 115
3. Потвърждаване на различията от цялостния геномен метилационен пул анализ при индивидуални пациенти 117
4. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 118
5. Валидиране на метода на метилационен ДНК микрочипов анализ 127
6. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 129
6.1. Калориметрични профили на кръвни серуми от пациенти с шизофрения 129
6.2. Определяне на концентрацията на серумните белтъци чрез капилярна електрофореза 135
6.3. Проследяване на протеомните промени с ДСК при пациенти с шизофрения 136
VI. Обсъждане 138
1. Обсъждане на резултатите от цялолостния геномен метилационен анализ на кандидат-гени за шизофрения 138
2. Обсъждане на разликите в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола 143
3. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 145
4. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 150
VII. Заключение 155
VIII. Литература: 159

Списък на използваните съкращения

Съкращения на кирилица:

ГАМК	Гама-амино-маслена киселина
ДЗ	Дизиготни близнаци
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
иРНК	Информационна рибонуклеинова киселина
МКБ 10	Международна класификация на болестите, десето издание
МЗ	Монозиготни близнаци
СЗО	Световна здравна организация
ЦНС	Централна нервна система
ЕДТА	Етилен-диамин-тетра-ацетат
РНК	Рибонуклеинова киселина

Съкращения на латиница:

aCGH	Микрочипова сравнителна геномна хибридизация
DMR	Диференциално метилирани региони
MeDIP	Имунопреципитирана метилирана ДНК
DSM-IV-TR	Международен диагностичен и статистически наръчник за душевни заболявания на Американската психиатрична асоциация, четвърто ревизирано издание
GWAS	Цялостно геномно асоциативно проучване
bp	Нуклеотидни двойки
NMDA	N-метил-D-аспартатна киселина (N-methyl-D-aspartic acid)
Odds ratio	Коефициент на относителен риск
PCR	Полимеразна верижна реакция
SNP	Единичен нуклеотиден полиморфизъм
HAT	Хистон ацетил трансфераза
ICRs	Регион за контрол на импринтинга
DNMT	ДНК метилтрансфераза

I. Въведение

През последните години протеомните и метилационните анализи намират все по-широко приложение в медицинските изследвания за анализ на биомаркери при различни заболявания и търсене на нови лекарствени средства. Първоначално голяма част от проучванията са фокусирани върху анализ при различни онкологични заболявания. В последните години обаче стана ясно, че този подход е много подходящ при изследване на етиологията и патогенезата на мултифакторните заболявания, сред които са и психиатрични болести като шизофрения. В България все още не са провеждани протеомни и метилационни изследвания в областта на молекулярната психиатрия.

Шизофренията е тежко мултифакторно психиатрично заболяване с висока популационна честота от 1%, което често протича хронично и е свързано със засягане на почти всички висши корови функции: социални, поведенчески, когнитивни, емоционални. Много от класическите симптоми са застъпени и при други психиатрични заболявания, което затруднява точното диагностициране.

Причините за шизофренията все още не са напълно изяснени, макар да се знае, че тя е резултат от сложно взаимодействие между генетична предиспозиция (със засягане на няколко гени, всеки от които сам по себе си има слаб ефект) и фактори на средата. Предполага се, че основна роля в етиологията играят грешки в развитието на нервната система и нарушения в метаболизма на някои невромедиатори или инфекциозни агенти. За момента диагнозата се поставя на базата на клинично интервю с пациента и не съществува етиологично насочено лечение, което е причина за високия интерес към заболяването в целия научен свят [1-4].

Голям брой автори от целия свят проучват генетичните фактори при най-значимите психиатрични заболявания. Съвременните постижения в областта на геномиката посочват редица кандидат хромозомни региони и кандидат гени за предразположеност към шизофрения, но все още данните са противоречиви. Протеомните и метилационните проучвания в областта на невробиологията и молекулната психиатрия са в начален стадий и до момента в света са проведени сравнително малък брой такива при основни психиатрични заболявания като

шизофрения, биполярно афективно разстройство и при различни зависимости.[3] Те имат за цел идентифициране на белтъци и метилационни промени, които имат отношение към етиологията и прогресията на болестта, откриване на по-добри и точни прогностични и диагностични методи, създаване на нови терапевтични средства с малко странични ефекти.

Настоящата научна разработка е етап от дългогодишни проучвания на нашия екип с цел идентифициране на генетичните основи и молекулните характеристики на основните психиатрични заболявания: шизофрения и шизоафективни разстройства, и биполярни афективни разстройства. Нашият подход се изразява в двуетапно цялостно-геномно метилационно проучване и протеомен анализ, изследване на динамиката на метилационните и протеомните профили след провеждане на лечение.

За момента цялостните геномни метилационни изследвания при шизофрения са в процес на разработване. Това е първото изследване на промени в метилационния и протеомния статус при пациенти с шизофрения в българска популация.

II. Литературен обзор

1. История на заболяването

Шизофренията (на гръцки: σχιζοφρένεια - разстройство на диафрагмата, тъй като в миналото се е смятало, че душата се помещава в диафрагмата) е психическо разстройство. За първи път заболявания от групата на шизофрениите е описана от френския писател Б. Морел през 1857г., под названието „Dementia praecox". Около 15 години по-късно Е. Хекер, К. Калбаум и В. Манян описват хебефренията, кататонията и халюцинаторно-параноидната форма на шизофренията, описана като „сложна прогресираща параноя", като самостоятелни заболявания. 1893-1896г. Е. Крепелин формулира концепцията си за „Dementia praecox", според която хебефренията, кататонията и сложната прогресираща параноя са различни форми на едно и също заболяване, чиито основни характеристики са: ранно начало и изход, свързан с тежък разпад на личността. През 1911г. Е. Блойлер за първи път въвежда понятието шизофрения. Етимологията на термина е с древногръцки корени схизо (σχίζειν - "разкъсвам, разцепвам") и френ- (φρήν, φρεν- - "мисъл, разсъдък"). Термина се базира на основната клинична характеристика на болестта – разкъсана душевност (schisis) (разцепване на „Аза"). За разлика от Е. Крепелин, Блойлер определя болестта като шизофрении – „група на шизофрениите – кръг на шизофрениите". През 1959г. психиатърът К. Шнайдер посочва „симптомите от първи ранг", които по негово мнение разграничават шизофренията от други психотични разстройства.

2. Епидемиология на шизофренията

Шизофренията е едно от най-разпространените психиатрични заболявания в света. Тя се характеризира с хроничен ход и води до задълбочаваща се личностова промяна и инвалидизация. Шизофренията е тежка форма на психиатрично заболяване, което засяга около 0,7% от населението предимно на възраст между 15 и 35 години. Заболеваемостта е относително ниска (0,03%), докато болестността е висока поради хроничното протичане на шизофренията [5, 6]. Болестността варира по света, между отделните държави или дори при по-малки групи. Според данни на Националния център по здравна информация на България болестността от шизофрения за 2013 година е 389,5 на 100 000 души, изчислени на база броя болни под наблюдение на психиатричните заведения, клиники, отделения, кабинети и амбулатории на 31.12.2013

[7]. Болестта често протича хронично и изисква високи разходи на медицински ресурси и финансови средства [6]. До скоро се е смятало, че заболеваемостта е около 1% и е еднаква по целия свят. От скоро стана ясно, че заболеваемостта варира между държавите и дори между населението в отделните държави [8].

Първоначалните симптоми обикновено се проявяват в ранна млада възраст, между 10-25 години при мъжете и 25-35 години при жените [9, 10]. Шизофрения може да се наблюдава и в детско-юношеска възраст с лоша прогноза [11] и в напреднала възраст с предимно хроничен ход и по-слабо личностово обедняване [9, 12].

Заболяването засяга 1,4 пъти по-често мъжете, отколкото жените [13]. Обикновено се проявява по-късно при жените и в по-лека форма (26 – 32 години) отколкото при мъжете (20 – 28 години) [13, 14].

Очакваната обща продължителност на живота на болните е с 15-20 години по-малка от тази на общото население [15], главно поради това, че се свързва с потенциално затлъстяване, заседнал начин на живот и пушене, като повишеният процент на случаите на самоубийство, свързван с това заболяване, играе по-малка роля [10].

3. Симптоми

Шизофренията се характеризира с качествени и характерни отклонения в мислите, възприятията, емоциите и вниманието. Характерно за заболяването е значителна клинична хетерогенност и припокриване на някои от симптомите с тези при други психиатрични заболявания [16]. Симптомите при шизофрения се разделят на три групи: позитивни, негативни и когнитивни. Към позитивните симптоми спадат: халюцинации, делюзии, дезорганизиране на речта, мисълта и поведението. Негативните симптоми се свързват с нарушение на нормалните емоции и поведение. Тези симптоми са трудни за диагностициране поради участието им в други състояния, например като депресия. Те са свързани със социалното отдръпване, липса на нормални емоционални чувства, липса на интерес и мотивация, липса на цел в живота, обедняване и забавяне на речта и мисленето, апатия, анхедония, абулия. Когнитивните симптоми като намалени изпълнителни функции, намалена възможност за концентрация, неуслужлива памет също трудно се разпознават [17].

По отношение на диференциалната диагноза на заболяването до момента не съществуват диагностични лабораторни тестове за диагностициране на шизофрения. Диагнозата се поставя на базата на изчерпателно клинично интервю с пациента, подробно събиране на анамнестични данни и при необходимост информация от членове на семейството, колеги и приятели [1, 18].

4. Лечение

Към момента лечението включва третиране с медикаменти и различни психо-социални интервенции [19]. Целта на лечението е да намали честотата и тежестта на психотичното изостряне, да облекчи голяма част от симптомите и да подобри функционалният капацитет и качеството на живот. Преди въвеждането на антипсихотичните лекарства преди половин век, стандартното лечение на шизофренията се състояло в осигуряване на пациентите на сигурна и подкрепяща среда чрез дълготраен престой в психиатрична клиника. Първият антипсихотик - хлорпромазин, е довел до революция във фармакотерапията на шизофренията [20].

За момента са известни повече от 60 антипсихотични лекарства, открити през последните десетилетия. Антипсихотиците традиционно се разделят на две групи: първо поколение (конвенционални) и второ поколение (атипични). Всички те водят до блокиране на допамин D2 рецепторите и последващо блокиране на деполяризацията [21-23]. Действието на антипсихотиците започва след няколко дни и продължава за няколко седмици [24, 25]. В момента съществуващите антипсихотици се различават по степента на блокиране на D2 рецепторите, която е от значение за техните клинични качества. По-високата степен на блокиране на рецепторите повишава страничните ефекти [21, 22]. Отделните лекарства се различават и по афинитета си към други невррецептори, което също обяснява разликите в страничните ефекти.

Антипсихотиците от първо поколение са ефективни при намаляването на позитивните симптоми като халюцинации и делюзии, но проявяват минимална ефективност за негативните и когнитивните симптоми, които допринасят основно за инвалидизирането при шизофрения [26]. Прилагането на конвенционални антипсихотици също е свързано със сериозни странични ефекти като остра екста-пирамидна симптоматика и забавена дискинезия [27].

Първият, така наречен атипичен антипсихотик е Clozapine. Въпреки че той не предизвиква остра екстра-пирамидна симптоматика и забавена дискинезия, има много странични ефекти като агранулоцитоза [22]. По тази причина неговата употреба е била значително ограничена в по-голямата част от света през последните две десетилетия. Впоследствие е установено, че той е много по-ефикасен от първо поколение антипсихотици при трудно поддаваща се на лечение шизофрения [28], понижава склонността към самоубийство [29] и е сравнително лишен от значителни кратко- и дългосрочни странични ефекти на мотриката. Това ускорява изследванията за разработване на по-ефективни и по-безопасни антипсихотици. Групата на антипсихотиците от второ поколение бързо се разраства и на 90% измества лечението с конвенционални антипсихотици. Те намаляват позитивната симптоматика като едновременно с това повлияват, както негативната, така и когнитивната симптоматика. При тяхната употреба по-рядко се наблюдава екстрапирамидна моторна симптоматика [30-32].

При изследвания, които сравняват първо и второ поколение антипсихотици по отношение на подобряването на качеството на живот се стига до извода, че атипичните антипсихотици не са много по-ефективни от конвенционалните и не водят до когнитивно и социално подобрение [33-35]. Това се обяснява с факта, че всеки медикамент има съответен профил на желан ефект и нежелани странични реакции и по тази причина лечението се избира според индивидуалния пациент - неговите симптоми, отговор към терапия, странични ефекти при предишно лечение и др. [36].

Всички известни антипсихотици блокират D2 рецепторите и по тази причина значително повлияват позитивните симптоми и дезорганизацията. Отговорът към терапията в първите 2-4 седмици е силно предсказуем за дългосрочния отговор към терапията [37, 38]. Ефектът от антипсихотичната терапия зависи и от стадия на болестта [39]. Пациенти в ранен стадий отговарят по-бързо и в по-голяма степен отколкото пациенти в по-късни стадии [40]. Антипсихотиците са по-неефективни по отношение на намаляване на негативните симптоми и по-голямата част от ефекта върху негативните симптоми може да се асоциира с намаляване на позитивните симптоми [41, 42]. Докато антипсихотиците могат да облекчат негативните симптоми, свързани с позитивните, то те могат да влошат негативните симптоми, свързани с EPS. Данните по

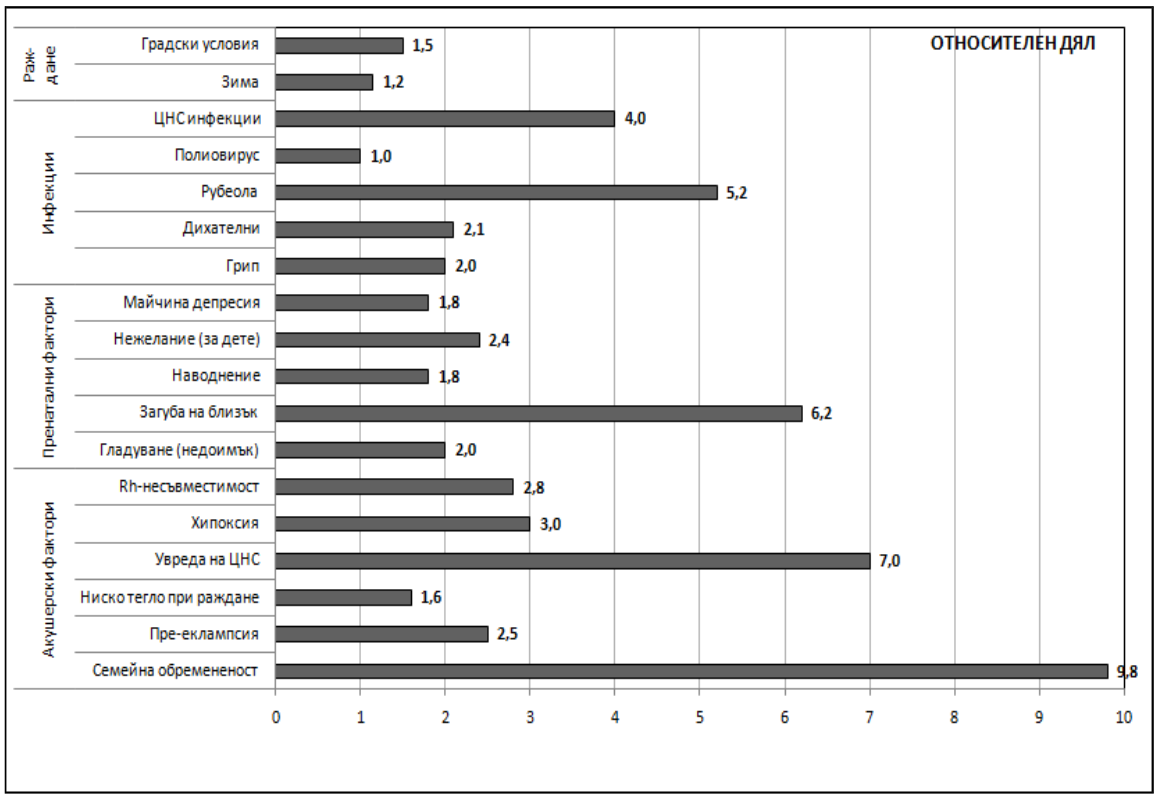
отношение на когнитивните симптоми все още са противоречиви [43]. Антипсихотиците значително намаляват вероятността за рецидив на заболяването [44].

5. Етиология на шизофренията

Все още етиологията на шизофренията не е ясна, но е известно, че за развитието на болестта имат отношение както генетични така и фактори на средата [45]. От биологична гледна точка шизофренията включва различни структурни и молекулярни аномалии в мозъка [46] и промени в невроналните връзки [47]. Генетиката играе важна роля в етиологията на заболяването. Наследствеността е около 81% [2]. Доказателство за общи или споделени влияния на околната среда по отношение на предразположението към шизофрения е 11% [2]. Точното съотношение между околната среда и генетичното предразположение за развитието на шизофрения все още е малко спорно. В последните десетилетия са докладвани множество асоциации между шизофрения и генетичните рискови фактори. Само малка част от тях могат да се считат за кандидат гени за шизофрения.

5.1 Външни фактори

Относително високата наследственост на шизофрения предполага, че генетичните фактори играят важна роля в етиологията на заболяването. От друга страна, редица фактори на околната среда значително могат да повлияят нейното развитие [48].



Фигура 1. Относителен дял на влияние на някои от рисковите фактори на средата в етиологията на шизофрения (преработено от Е. Бечева 2010) [49-51]

Част от факторите на средата могат да окажат влияние в ранните етапи на развитие още по време на бременността или раждането, докато други като социалните фактори имат ефект в по-късните етапи от индивидуалното развитие [49, 52] Фиг. 1.

5.1.1. Инфекции и имунна система

Пациенти, чиито майки са били във втори триместър на бременността по време на грипна епидемия имат по-висок риск за шизофрения [53-55]. Инфекция по време на бременността, като рисков фактор подкрепя хипотезата за проблеми в развитието на нервната система при шизофрения [56]. Последващи проучвания правят индивидуална оценка на инфекциите, сравняват антителата при възрастни с шизофрения в сравнение с нормални индивиди [57]. Пациенти с антитела срещу Toxoplasmosis Gondii имат по-висок риск от заболеваемост от шизофрения [58]. Друго проучване показва 5,2 относителен риск за развитие на шизофрения на индивиди с доказана инфекция от вируса на рубеола по време на развитието на плода [59]. Установен е по-висок риск за психози при индивиди, чиито майки имат по-високи нива на антитела срещу херпес симплекс вирус [60]. Изследване в Бразилия сравняващо лица, които са имали

менингит, с техните сибси, които не са имали менингит открива, че болестността от психози и по-специално шизофрения, е пет пъти по-висока при тези, които са прекарали менингит [61]. Откритието е интригуващо, защото средната възраст на инфекция с менингит е 26 месеца, т.е. много по-късно, отколкото протича една пренатална инфекция. Ако се потвърди при други изследвания това твърдение би противоречило на теорията за развитието на нервната система при шизофрения [49, 50, 62].

5.1.2. Усложнения при бременността и раждането

Други фактори през пренаталния период, предразполагащи към повишен риск от развитие на шизофрения са недохранване на майката през ранните етапи на бременността (обяснява повишения риск за развитие на болестта при второ или следващо дете), Rh-несъвместимост на майката и плода, стрес или депресия на майката или нежелана бременност.

През последните петнадесет години е имало много изследвания и няколко мета - анализи за отчитане на коефициентът на относителен риск (около 2) при пациенти с различни видове усложнение при бременност и раждане [63, 64]. Последващи анализи са започнали да уточняват индивидуалните усложнения при раждане, с надеждата за изясняване на причинно-следствения механизъм. Един скорошен мета-аналитичен преглед подразделя видовете усложнения при раждането като: 1), усложнения на бременността (кървене, диабет, резус несъвместимост, преeклампсия) ; 2) абнормен фетален растеж и развитие (ниско тегло при раждане, вродени малформации, намалена обиколка на главата, и 3) усложнения при раждането: маточна атония, асфиксия, спешно цезарово сечение) [65]. Различните усложнения предполагат като възможна причина недохранване [66], недоносеност и хипоксия или исхемия [63, 67].

5.1.3. Сезон на раждане

Отдавна е известно, че пациенти с шизофрения родени през зимата имат 10% по-висока вероятност да развият шизофрения в сравнение с тези родени през лятото, независимо дали са в северното или в южното полукълбо. [68, 69]. Едно вероятно обяснение е, че майката е била във втори триместър от бременността в разгара на грипния сезон и инфекциите през този период повишават риска за шизофрения в потомството. Друго обяснение, предложено от скорошно проучване показва, че

сезонните ефекти могат да увеличат риска от шизофрения чрез взаимодействието с генетична предразположеност [70].

5.1.4. Възраст на родителите

От средата на 20-ти век голям научен интерес има в изследването на ролята на напредналата възраст при родителите за по-високия риск от шизофрения. Все още данните са противоречиви. Според някои изследвания родителите на пациенти с шизофрения са средно 2-3 години по-възрастни от тези на общата популация [71], докато други изследвания показват вероятност от по-висок риск от шизофренията при бащи, а не майки в по-напреднала възраст [63, 72]. Наскоро няколко популационни епидемиологични проучвания в Дания, Израел, Швеция и Обединеното Кралство са представили по-убедителни доказателства за ролята на бащината възраст при шизофрения [73-75]. Популационно изследване на кохорти в Израел установява, че относителният риск за шизофрения при пациенти с бащи на възраст от 55 или по-висока е 2,96 в сравнение с родители на възраст 20-24. Освен това, проучване на случаи-контроли показват, че възрастта на майката не е значителен предиктивен маркер за развитие на заболяването [74]. Асоциацията на напредналата бащина възраст с повишен риск от шизофрения е от значение при пациенти без фамилна анамнеза, което показва възможността за натрупване на de novo мутации в бащините сперматозоиди [76].

5.1.5. Пол и семейно положение

Наблюдава се повишена заболеваемост при мъжете в сравнение с жените като това е свързано с по-тежко протичане и по-лоша прогноза [52]. При някои изследвания е установен по-висок риск за развитие на болестта при несемейните поради по-значителна социална изолация и стрес. [49, 52]

5.1.6. Автоимунни заболявания

Литературни данни показват, че лица с шизофрения имат необичайна устойчивост или чувствителност към автоимунни заболявания [63]. Пациенти с шизофрения имат много по-малка вероятност да развият ревматоиден артрит [77]. Предполага се, че антипсихотиците имат предпазваща роля за развитието на ревматоиден артрит по все още неизвестен механизъм, въпреки че някои от проучванията са проведени преди навлизането на невролептиците в употреба. По тази

причина се предполага, че един-единствен ген повишава риска за развитие на едно заболяване и предпазва от друго [63]. Изследвания на случаи-контроли показват, че лица, приемащи нестероидни противовъзпалителни лекарства, които основно се използват за лечение на артрит, имат по-малък риск от развитие на деменция [78, 79].

Други автоимунни заболявания са свързани с шизофрения, включително болести на щитовидната жлеза [80], диабет тип 1 [81], и цьолиакия [82]. В момента доказателствата са най-силни за заболявания на щитовидната жлеза и цьолиакия. В проучване на датските регистри на населението, лицата, чиито родители имат цьолиакия имат три пъти по-висок риск по-късно да развият шизофрения. Цьолиакията е заболяване, свързано с имунна реакция към пшеничен глутен. Едно възможно обяснение е, че повишената пропускливост на червата, предизвикана от цьолиакията повишава нивото на антигенно излагане и повишава риска от автоимунна реакция. Възможно е също така глутена да се разгражда до психоактивни пептиди [83].

Резултатите, асоцииращи шизофренията с автоимунни заболявания, се съпътстват от клинични и лабораторни изследвания на автоимунните процеси при шизофрения. Очевидно е, че има нарушения на имунната система при шизофрения, но не е ясно дали те са причина или следствие от шизофренията или нейното лечение [84]. Възможно е слабост в имунната система при пациенти с шизофрения да обяснява, както данните за инфекции, така и резултатите от автоимунните заболявания, но това остава да бъде доказано [85]. Провеждат се клинични изпитвания на противовъзпалителни [86] и антибиотични [87] агенти за лечение на шизофрения.

5.1.7. Злоупотреба с канабис

Има множество изследвания на случаи и контроли, които показват, че пациенти с шизофрения е по-вероятно да използват канабис [88]. Проучвания в Швеция, Холандия, Нова Зеландия и Израел, показват по-висок риск в границите от 2 до по-висок от 25 [89, 90]. От друга страна, има проучвания, според които употребата на канабис ускорява или дори причинява шизофренен епизод [91-93].

5.1.8. Урбанизация

През 1930-те год. Faris и Dunham показват, че маниакално-депресивните заболявания са разпределени в по-голяма степен в централните части на градовете. Относителният риск е около 2-4 пъти по-висок за тези, родени в крайградските райони.

Трудността е в идентифицирането на биологичен процес, свързан с живеенето в крайградските райони. То може да включва разлики във физическата среда, като по-високата концентрация на олово в почвата и въздуха в градовете; различия в културната среда, като например очакването за напускане на дома и създаването на ново семейство [94], различия в раждаемостта, кърменето [95, 96], пренаселването, което би могло да позволи разпространението на инфекции [97] и множество други фактори [98].

5.1.9. Семейни и социално-икономически предпоставки

Мащабно проучване при деца в Швеция, които имат риск от развитие на психоза по отношение на пет социално-икономически показатели (като по-нисък социално-икономически статус и домакинствата с един родител), установява, че социалните проблеми в детството са свързани с повишен риск от развитието на психози [99].

Скорошно проучване в Обединеното кралство, което отчита ефектите от дългосрочната (> 1 година) раздяла на родителите или загуба, преди навършване на 16 години показват два до три пъти по-висок риск от психози, независимо от фамилната обремененост [100].

В литературата са докладвани по-високи нива на физическо и сексуално насилие при пациенти с психоза в детска възраст в сравнение с контроли [101]. Въпреки доказателствата, сочещи асоциация между злоупотреби в детска възраст и психоза, това ще се окаже трудно за определяне, имайки предвид трудните методологични и инструментални въпроси, свързани с изучаването на тази област.

При мащабни изследвания е установен по-благоприятен ход на болестта при пациенти от развиващите се спрямо развитите страни [102-104]. Все още тези резултати са противоречиви. Предполага се, че по-добрите показатели в развиващите се страни се дължат на по-рядко разделяне от семейството, тъй като това подпомага терапията, по-лесното реинтегриране в работната среда, по-рядко отделяне на пациента в психиатрично лечебно заведение [8, 49].

5.1.10. Етническа принадлежност и расизъм

Нивата на шизофрения са най-високи сред афро-карибската популация в Лондон, когато те живеят в области, където образуват сравнително по-малък дял от

населението. Тези констатации намекват за възможна роля за социалното изключване, дискриминация и изолация [105]. Други проучвания обръщат внимание на социални показатели, като напр. по-самотен живот, дългосрочна безработица, липса на близки и доверени хора. Установено е, че колкото повече такива фактори има при един индивид в началото на зрелостта, толкова по-голяма вероятност има от развитие на психотично разстройство [8]. Необходима е допълнителна работа, за да се характеризира по-ясно естеството на тези твърдения.

Етническата принадлежност е характеристика, с която относително лесно се идентифицират индивидите и която показва обща история с други индивиди. Маркери на етническия статус включват раса, страна на произход и религия. Страната на произход се е доказала като сигурен рисков фактор за шизофрения в Обединеното кралство и Холандия. В Обединеното кралство, имигранти от Африка или Карибите и тяхното второ поколение, имат нива на шизофрения до десет пъти по-високи от тези в общата популация [106]. Тъй като имигрантските групи, които не са чернокожи нямат по-високи нива на шизофрения и тъй като е засегнато второто поколение малко вероятно е това да се дължи на стреса от имиграцията. Тези проценти в страните на произход не са повишени, поради което е малко вероятно да се дължи на генетична разлика между расите. Причината е свързана с психологическите условия, които могат да бъдат дискриминация или трудности, свързана с планиране на живота при най-нисшите прослойки на обществото, когато бъдещето е несигурно за расовите групи на дъното на обществото [94, 107].

Две проучвания във Великобритания показват, че там е много по-висок рискът от шизофрения в сибси, отколкото при родителите на пациенти с шизофрения от афро-карибски произход. Рисковете на последните е сходен с тези на белите индивиди, което предполага или действие на фактори на околната среда върху второто поколение от афро-карибски произход или взаимодействие ген-среда [108, 109]. Тези открития наскоро са повторени в Холандия. Проучвания на психотични разстройства в етническите малцинства в Холандия показват, че честотата на шизофрения корелира с възприемането на дискриминацията [110]. Изводът е, че за малцинствена етническа група, силно подложена на дискриминация, това може да бъде по-силен рисков фактор отколкото самата имиграция. Сред такива етнически групи, които подлежат на високи нива на дискриминация, някои хора могат да интерпретират тази форма на

дискриминация лично за тях, като по този начин се инициират мисли за преследване и параноидно по същество поведение [105].

5.2. Патогенетични хипотези за шизофрения

Съществуват няколко хипотези по отношение на патофизиологията на шизофренията. Основно те са свързани с проблеми в невротрансмисията, развитието на нервната система и имунологичния отговор.

5.2.1. Хипотези, свързани с нарушения в невротрансмисията

Основните невротрансмитери, участващи в патогенезата и лечението на шизофренията са допамин и серотонин. Последващи теории предполагат участието и на глутамин и ГАМК [111].

5.2.1.1. Допаминергична хипотеза

Основната хипотеза, свързана с нарушение в невротрансмисията е допаминергичната. Според нея симптомите на шизофренията са резултат от повишена невротрансмисия основно в corpus striatum и мезолимбичните участъци на мозъка (позитивните симптоми) и допаминергичен дефицит в префронталните лобове (негативните симптоми). Когнитивните симптоми се асоциират с по-висока плътност на допаминови D2-рецептори в nucleus caudatum и участие на кортикостриалните пътища [112]. Образни изследвания показват повишена плътност на D2 допаминовите рецептори в мозък [113]. Ролята на допамина е установена вследствие на ефекта на амфетамините, кокаина и други подобни вещества върху нервната система. Установено е, че те водят до повишени нива на допамин в мозъка и причиняват симптоми, наподобяващи тези при психози. При пациенти с шизофрения, лекувани с препарати за повишаване на допамина се наблюдават психотични странични ефекти, наподобяващи симптомите при шизофрения [114, 115]. Някои антипсихотици, като напр. хлорпромазин и халоперидол възпрепятстват свързването на допамина, най-вече към D2 рецепторите като по този начин понижават позитивната симптоматика. Афинитетът на свързване на антипсихотични лекарства към D2 допаминовите рецептори е обратно пропорционален на тяхната терапевтична доза [115].

Установена е значителна асоциация на шизофренията и алел A2 на Taq 1A полиморфизма на гена за D2 допаминовите рецептори (*DRD2*) [116, 117]. Данните по

отношение на полиморфизмите Ser311Cys и 141C Ins/del са противоречиви [118-120]. Най-значимия от полиморфизмите на *DRD2* гена е C957T [121, 122].

D3 допаминовите рецептори са локализирани предимно в лимбичния дял на нервната система и също имат отношение към симптомите на шизофренията. Ser9Gly полиморфизмът показва силна асоциация със заболяването, тежестта на симптомите и ефекта от лечението [123-125]. Според мета анализи *DRD3* гена определя относително нисък риск за развитие на шизофрения [126].

BDNF гена е член на семейството на неуротрофин растежните фактори и подпомага развитието, регенерацията и преживяемостта на невроните. Той играе значителна роля в развитието на мезолимбичната допаминергична система и регулира експресията на допаминовите D3 рецептори [127]. Предполага се връзка между *BDNF* регулираната допаминова невротрансмисия и развитието на шизофрения [128]. Установена е асоциация на C270T полиморфизма на *BDNF* гена и заболяването [129].

5.2.1.2. Глутаматергична хипотеза

Според някои автори допаминергичната дисфункция е последващо събитие след глутаматергичната. Хипофункцията на глутамат медиираната сигнализация в кортико-стриаталните неврони води до увеличена сензорна стимулация и в последствие до психотични симптоми и промени в допаминовата концентрация. Някои видове глутаматергични рецептори като NMDA рецепторите, вземат участие в сигналните пътища, свързани с паметта. Смята се, че NMDA рецепторите са отговорни за екситаторна токсичност и последващите възпаление на нервната тъкан и апоптоза. NMDA рецепторите се състоят от 3 субединици. Генетични вариации при една от тях определя активността на префронталния дял на мозъка при концентрация [130]. Някои антагонисти на NMDA рецепторите са потенциални активатори на допаминово освобождаване, което може до доведе до психотични симптоми при здрави индивиди и обостряне на симптомите при болни от шизофрения [131].

Агонист на метаботропния глутаматен рецептор 2/3 (mGlu2/3) е използван като първото лекарство, което не действа като допаминов антагонист [132]. Това лекарство подобрява позитивните и негативните симптоми подобно на оланзапина, но не води до увеличена продукция на пролактин, екстрапирамидални симптоми или повишаване на теглото [132].

По отношение на гените за глутаматните транспортери е установена асоциация при някои популации на *SLC1A6* и *SLC1A2* гените и шизофрения [133, 134]. Подобна връзка има и с полиморфизъм в 5' края на *GRIN1*, кодиращ субединица на NMDA рецепторите [135].

Неурегулин 1 (*NRG1*) и неговия рецептор ErbB4 също имат връзка с развитието на шизофрения [136, 137]. Активирането на *NRG1* подпомага бързото интернализиране на NMDA рецепторите по клатрин-зависим механизъм в префронталните пирамидални неврони [138]. Свръх активиране на *ErbB4* от *NRG1* потиска активността на NMDA рецепторите [139]. Докладвани са данни за асоциация на генетични варианти в *NRG1* гена и шизофрения [137, 140-142].

Гените *DTNBP1, DAAO* и *GRM3* са експресирани в човешки мозък. Те имат важна роля за когнитивните функции и паметта и участват в глутаматната невротрансмисия [1]. Генетични варианти в тези гени имат отношение към развитието на шизофрения [143-146].

5.2.1.3. ГАМК-ергична хипотеза

Ензимите, свързани с биосинтезата на ГАМК се експресират в променени нива в постмортем мозъчни проби при пациенти с шизофрения [147]. Понижени нива се откриват в префронталните и темпоралните лобове и имат отношение към регулацията на допаминергичната невротрансмисия [52, 111] като понижените нива на ГАМК се асоциират с повишени нива на допамин [52]. При пациенти с шизофрения са установени промени в нивата на ГАМК-рецепторите, ГАМК-транспортерите и основния ГАМК-синтезиращ ензим GAD67в постмортем мозъчни проби. [148, 149].

5.2.2. Хипотеза, свързана с развитието на нервната система

Въздействия на външни фактори по време на ембрионалното и феталното развитие на мозъка могат да доведат до неправилни синаптични контакти и променена междуклетъчна сигнализация. В по-късни етапи от индивидуалното развитие това може да доведе до когнитивна, емоционална и психологическа дисфункция [150, 151]. С помощта на невробиологични, образни и функционални изследвания на нервната система са разкрити някои функционални и структурни промени в мозъка, които засягат основно хипокампуса, префронталните и горната част на темпоралните лобове на мозъка [152]. При нелекувани пациенти с начална форма на заболяването се

наблюдава увеличение на размерите на мозъчните стомахчета, намаляване на мозъчния обем, промяна в размера и нагъването на мозъчната кора и промени във формата на хипокампуса [153]. Предполага се, че тези структурни промени са резултат от нарушения в каскади в ранното развитие. Наблюдават се също и нарушения в синаптичните връзки и миграцията. Загубата на невропил корелира с атрофията на мозъка [154, 155].

Най-вероятно събития през втория триместър на бременността като напр. инфекция на майката или пери-/постнатални усложнения могат да доведат до развитието на шизофрения в потомството. Установен е пет пъти по-висок риск за развитието на психози след инфекция на централната нервна система в ранно детство или хипоксия по време на раждане. Повече от 50% от гените, имащи отношение към развитието на заболяването подлежат на регулация от хипоксията (напр. *AKT1, BDNF, CAPON, CCKAR, CHRNA7, CNR1, COMT, DNTBP1, GAD1, GRM3, IL10, MLC1, NOTCH4, NRG1, NR4A2/NURR1, PRODH, RELN, RGS4, RTN4/NOGO* и *TNF-alpha*).

5.2.3. Имунологична хипотеза

Епидемиологичните данни сочат за връзка между шизофренията и грип както и признаци на възпаление в мозъка при шизофреници [156, 157]. Инфекция на майката по време на бременност се асоциира с развитие на шизофрения в поколението [158, 159]. В няколко изследвания е установен повишен титър на антитела към Toxoplasma gondii при индивиди, развили заболяването [160].

Има данни за намалена продукция на интерлевкин 2 (IL-2) и интерферон гама (IFNG) в резултат на нарушен тип 1 имунен отговор [157]. Тази хипотеза може да бъде подкрепена от понижените вътреклетъчни адхезионни молекули (ICAM) [161] и намален отговор на лимфоцитите след стимулация [157].

Предполага се, че имунния отговор тип 2 при шизофреници е по-силно активиран [162]. Тези предположения се базират на повишените нива на IL-6 [163], увеличената продукция на имуноглобулини и по-високите нива на IL-10 и IL-4 в гръбначно-мозъчната течност при шизофреници [157]. В резултат е налице дисбаланс между индолеамин 2,3 диоксигеназа (IDO) и триптофан 2,3-диоксигеназа (TDO) [157] и съпътстваща промяна в регулацията на астроцитите. Дисбаланса между тип 1 и тип 2

имунния отговор при шизофрения частично се нормализира след антипсихотична терапия [164].

Като най-силен кандидат за предразположеност към шизофрения в кавказка популация е определен IL-1B [165]. Той е свързан с подобрение на негативните симптоми и положителен ефект от антипсихотичното лечение [166]. Полиморфизми в този ген се асоциират с значително увеличаване на вентрикулите при пациенти с шизофрения [167]. Полиморфизми в IL-2 и IL-4 също се асоциират със заболяването [168].

5.2.4. Епигенетична хипотеза

Според съвременните схващания относно развитието на шизофренията като ключов етиопатогенетичен фактор се считат нарушения в епигенетичните механизми [169, 170]. Наблюдава се променена експресия в ГАМК-ергичните неврони на reelin, GAD1/GAD67, ГАМК транспортери, NMDA рецептори и др. в резултат на промоторно хиперметилиране, дължащо се на свръхекспресия на ДНК метилтрансфераза I. [171]. Докладвани са допълнителни епигенетични модификации в специфични промотори като променено ДНК метилиране и хроматиново ремоделиране чрез хистонови модификации, които водят до неактивно състояние на хроматина. Това заглушаване на промоторите понижава транскрипцията на съответните mRNA-и и причинява психотични симптоми.

6. Генетична предразположеност

6.1.Тип на унаследяване при шизофрения

Генетичните епидемиологични изследвания показват, че индивидуални вариации в чувствителността към шизофрения до голяма степен се дължат на генетични фактори, но начина на предаване все още не е известен. От историческа гледна точка първоначално се е предполагало, че има рецесивен тип на унаследяване с пълна пенетрантност [172]. Други автори са предположили доминантно унаследяване с непълна пенетрантност [173]. В последствие тези хипотези са отхвърлени поради невъзможност да обяснят вероятността за развитие на болестта при близнаци и роднини с различна степен на родство със засегнатите. Приема се теорията за смесения модел на унаследяване. При него има един основен ген (най-вероятно с рецесивно унаследяване), който е отговорен за генетичната предразположеност в комбинация с други полигенни

и средови фактори [174]. Полигенният модел на унаследяване обяснява развитието на болеста с участието на голям брой гени [175]. Друг не толкова разпространен модел е хетерогенният, при който шизофренията се състои от няколко различни състояния с различна етиопатогенеза [176]. Като най-вероятен се приема мултифакторният полигенен „прагов" модел [177-179].

Много от т.нар. социално значими заболявания при човека, засягащи голям брой от хората в популацията са мултифакторни, като напр. психиатричните заболявания. За разлика от моногенните заболявания, типът на унаследяване на мултифакторните заболявания е по-сложен и не може ясно да се определи. Не се унаследява самото заболяване, а предразположеността за развитието му. Въпреки че е ясно, че шизофренията има генетична компонента, честотата с която монозиготните близнаци са дискордантни предполага, че се унаследява предразположеността към унаследяване на заболяването. Твърдението се подкрепя и от изследванията на поколението на дискордантни монозиготни близнаци, които показват сравними рискове между потомството на засегнатите и незасегнатите близнаци. Това показва, че специфични генетични фактори, водещи до предразположеност към шизофрения, се предават, без да е необходимо да се експресират [180].

Според т.нар. прагов модел за мултифакторните заболявания, разпределението на предразположеността към мултифакторни заболявания в популациите следва Гаусово разпределение. Заболяването се развива само при индивиди след определен критичен праг на генетична предразположеност в резултат на действието на определени фактори на средата. Мултифакторните заболявания се характеризират с участието на няколко гена, които имат слаб, адитивен ефект и не могат самостоятелно да доведат до развитието на болестта, но създават генетична предразположеност. Определени фактори на средата, въздействащи върху индивид с генетична предразположеност, могат да отключат болестта. Някои генни варианти създават предразположеност; а други имат защитен ефект и намаляват риска от развитието на дадено заболяване. Подобно протективно или рисково действие могат да имат и факторите на средата [16, 111, 181]. При различни изследванията е установено, че риска за развитие на болестта намалява бързо с увеличаване на степента на родство със засегнатия индивид. [180].

При мултифакторните заболявания най-често срещания модел на унаследяване е олиго- или полигенен. Индивидуалната предразположеност към развитие на психиатрично заболяване включва комбинирания ефект от унаследяване на различни предпазващи или предразполагащи алели на различни гени. Има вероятност при част от случаите на шизофрения заболяването да е резултат изцяло или до голяма степен от високо пенетрантни мутации или хромозомни аномалии. В момента делът на тези случаи, които се дължат на такива събития е малък (по-малко от 1%).

При мултифакторните заболявания не може да се определи конкретна стойност на риска за заболяване при конкретен индивид. Рискът за дадено мултифакторно заболяване в дадена популация може приблизително да бъде оценен на базата на емпирични данни, получени от епидемиологични проучвания. Посочената стойност е средностатистически изчислена за конкретната популация, при определени условия, за определен период от време. Рискът може да варира сред различни популационни подгрупи и може да се изменя с времето [181].

6.2. Фамилни, близначни и адоптивни проучвания

Генетичната епидемиология изяснява относителния дял на генетичните фактори и факторите на средата в патогенезата на заболявания сред група от родствени индивиди или сред популацията. Това се осъществява с помощта на няколко основни метода: фамилни, близначни и адоптивни проучвания. В резултат от такива проучвания се натрупват емпирични данни с помощта, на които може да бъде доказана мултифакторната природа на дадено заболяване и да се оцени влиянието на генетичните и негенетичните фактори върху развитието и формирането на патологичния фенотип.

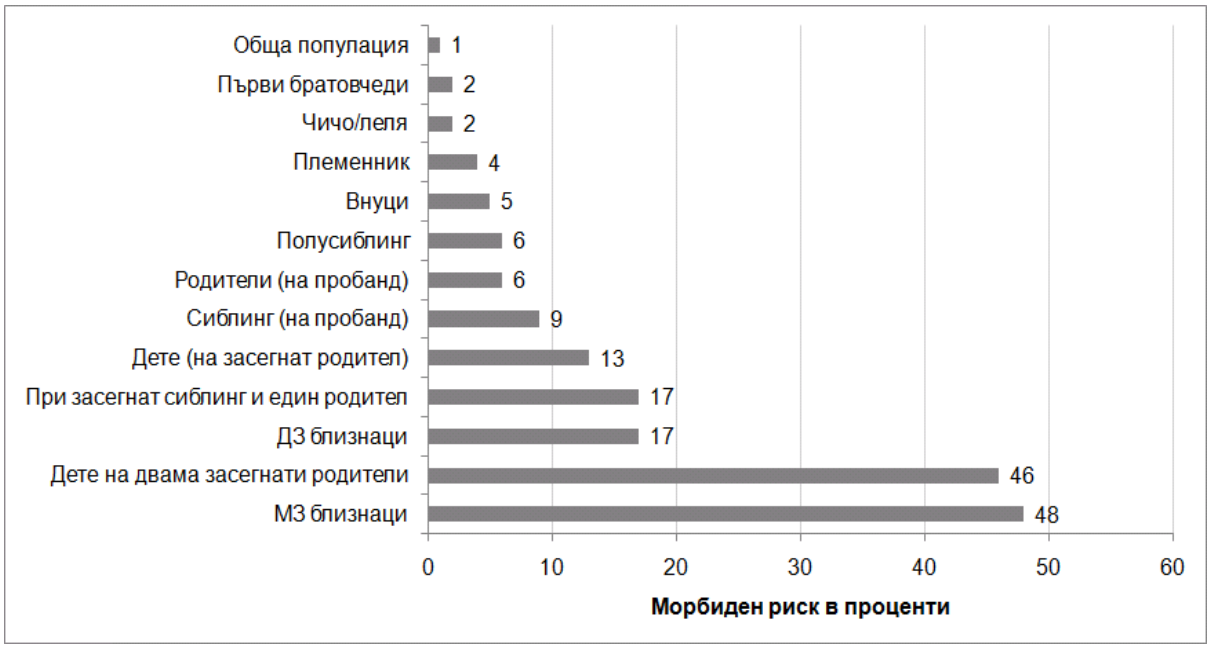
Унаследяването при шизофрения има значителен генетичен компонент. Множество проучвания показват, че рискът за роднините на пробанд с шизофрения е по-висок от този на роднините на контроли [182]. На базата на фамилни и близначни проучвания, публикувани между 1920 и 1987 г. е установено, че рискът за едноядрени близнаци е 48%, 11% за роднините от първа степен, 4,25% – за роднините от втора степен и 2% за роднини трета степен [183]. Заболеваемостта от шизофрения е по-висока при биологичните родители на осиновени деца отколкото при техните осиновители [184].

В едно епидемиологично проучване в различни райони на Ирландия е установено, че риска за шизофрения сред роднини от първа степен на изследваните лица е 6.1 % и че рискът сред сибсите е 8,3%, което надвишава това сред техните родители (1.4 %) [185].

6.2.1. Фамилни проучвания

При фамилните проучвания се изследват членовете на голям брой семейства, в които има индивиди, болни от шизофрения и се сравняват с общата популация. Определя се какъв процент от родствениците на пробанд с дадено заболяване (според степента им на родство с него) са засегнати от болестта, като данните се сравняват с тези в семейства на здрави контроли. Когато в едно семейство има няколко болни индивиди, тогава има данни за фамилност на заболяването и рискът в семейството е по-висок, отколкото в общата популация. Фамилните проучвания имат недостатъка, че с данните от тях не може да се оцени относителния дял на генетичните и негенетичните фактори в патогенезата на болестта [186].

Фамилните изследвания показват, че рискът от шизофрения се увеличава в близките на пациенти със заболяването. Рискът за развитието на шизофрения в популацията е 1%. Това контрастира със риска при сибсите, който е 9% и риска при потомството на засегнат пробанд, който е 13%. Рискът за родителите е нисък 6% поради затруднената репродукция в резултат на заболяването. Поколението на двама болни родители има 46% риск за развитие на заболяването [180] (Фиг. 2).



Фигура 2. Относителен риск за развитие на шизофрения (морбиден риск) сред родственици на пробанд [4, 16]

Скорошно проучване в Швеция изследва приблизително 9 милиона индивида от около 2 милиона семейства [187]. Роднините от първа степен на хора с шизофрения имат приблизително девет пъти повишен риск в сравнение с този на общата популация, което потвърждава резултатите от предишни изследвания [188].

6.2.2. Близначни проучвания

С помощта на близначните проучвания е възможно разграничаването на мултифакторно от моногенно заболяване или патология, дължаща се на екзогенни фактори и да се определи относителния дял на генетичните и негенетичните фактори при формирането на фенотипа. Близначните проучвания се основават на сравняване на монозиготни (МЗ) близнаци, при които има 100% генетична идентичност с дизиготни (ДЗ) близнаци, които споделят около 50% общи гени, по отношение на даден фенотип. Предполага се, че дадена двойка моно- или дизиготни близнаци е изложена на действието на сходни рискови фактори на средата [49, 181].

За идентифициране на типа на унаследяване на „фамилни" заболявания при близначни проучвания може да се използва т.нар. формула на Холцингер (Holzinger):

$$H = (K_{MZ} – K_{DZ}) / (100 – K_{DZ}),$$

където K_{MZ} е конкордантността между монозиготни близнаци, а K_{DZ} – между дизиготни близнаци. Полученият коефициент H - степен на унаследяемост, може да има стойност от 0 до 1 (0 до 100%), като при моногенни дефекти, зависещи изцяло от генетичните фактори, стойността му е 1, а колкото по-голямо значение имат външните фактори, толкова е по-близък до 0. При мултифакторните заболявания коефициентът H винаги е някъде между 0 и 1 и е различен при различните заболявания. H показва относителният дял на генетични и негенетични фактори при формирането на патологичния фенотип, но не и какъв е рискът да се унаследи [189].

Унаследяемостта при редица мултифакторни заболявания е оценена предимно на базата на близначни проучвания. Едни от най-високите степени на унаследяемост са установени при биполярни афективни разстройства (80-90%) и шизофрения - около 80%.

При шизофрения са проведени множество близначни проучвания [2]. Мета - анализ на 14 проучвания на близнаци от шест страни показва наследственост от около 81%, както и значителен общ компонент на околната среда от 11 % [2]. На базата на пет близначни изследвания е установено, че нивото на конкордантност при монозиготните близнаци е между 41–65%, в сравнение с 0–28% при дизиготните, съответстваща на наследственост от около 80-85% [190].

6.2.3. Адоптивни проучвания (проучвания на осиновени деца)

Адоптивните проучвания се използват за оценка на относителния дял на генетичните и негенетичните етиологични фактори при мултифакторните заболявания. При тези изследвания се елиминира ефекта на общата околна среда и се разкрива ролята на генетичните фактори. [4, 52]Адоптивните проучвания биват три основни вида[49]:

- „adoptee studies” - сравнява риска между осиновени деца с болни биологични родители и осиновени деца, чиито биологични родители не са болни.
- „adoptee’s family studies” - сравнява риска сред биологичните родители и осиновителите на осиновени пробанди със заболяването, с риска сред биологичните родители и осиновителите на осиновени деца без заболяване.

- „cross-fostering design” - сравнява риска за осиновени деца на болни биологични и здрави осиновяващи родители, с риска при осиновени деца на здрави биологични и болни осиновяващи родители.

Осиновеното потомство на майки с шизофрения показва повишен риск за развитие на болестта в сравнение с осиновеното потомство на здрави индивиди [188]. Осиновените пациенти с шизофрения по-често имат роднини със заболяването отколкото осиновените контролни здрави индивиди [188]. Датско адоптивно изследване определя 7,9% от роднините първа степен на осиновени деца с шизофрения развиват заболяването, сравнено с 0,9% от роднините на контролната група осиновени деца [191].

Адоптивните изследвания показват, че общите гени, а не общата среда са в основата на повишения риск за развитие на шизофрения при роднини. Това твърдение се подкрепя и от резултатите от близначни проучвания.

6.3.Методични подходи за идентифициране на генетичните основи на шизофренията

Има три основни подхода при идентифициране на гени, свързани с развитието на мултифакторно заболяване [1]:

• анализи за скаченост;

• асоциативни проучвания;

• определяне на хромозомни аномалии.

Анализът за скаченост и асоциативните проучвания се основават на анализ на честота на разпространение на определени хаплотипни групи – сред група от близко родствени индивиди (семейство) при анализа за скаченост, или сред популацията при асоциативните проучвания. С помощта на анализите за скаченост се търсят кандидат хромозомни райони, а с помощта на асоциативни проучвания се анализират кандидат гени. [192]

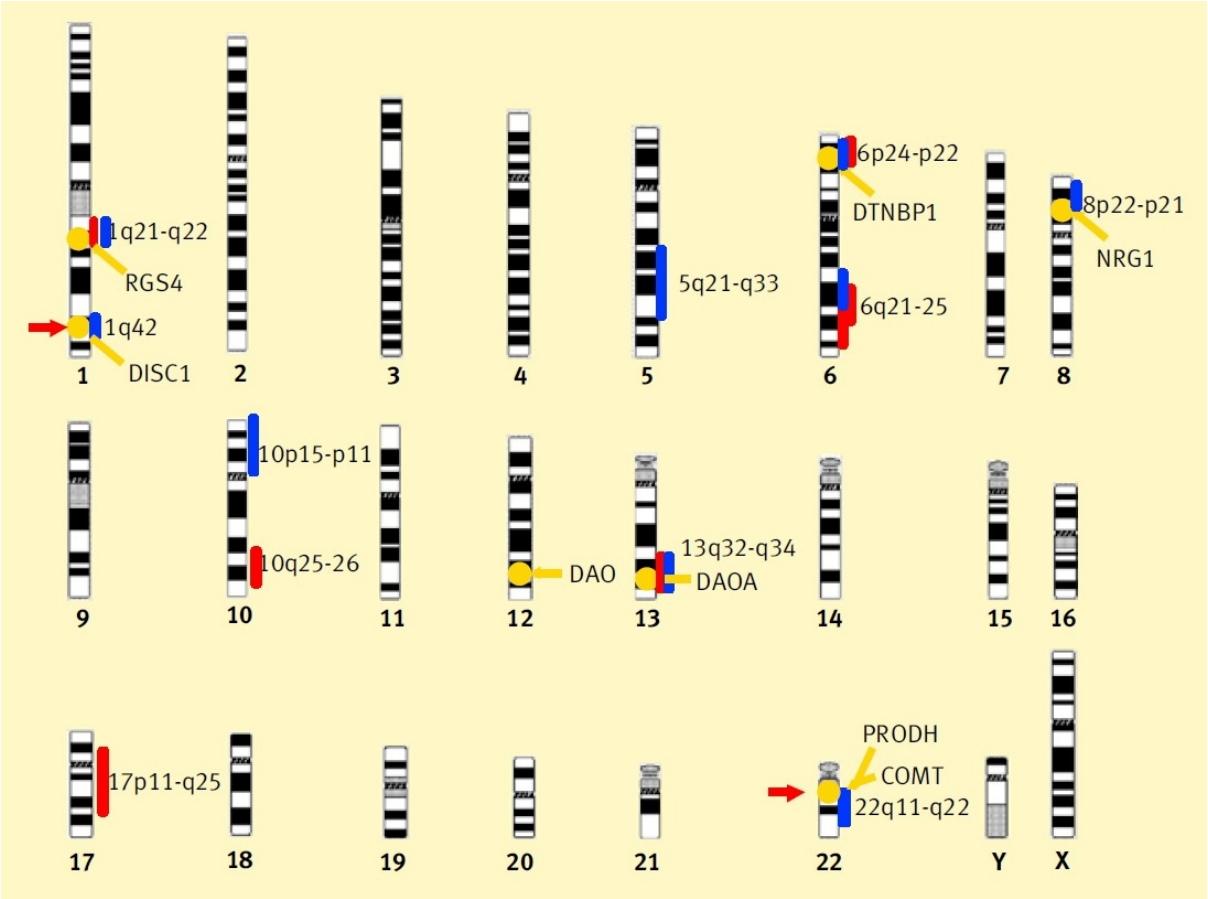
6.3.1. Анализи за скаченост

Целта е да се идентифицират региони от генома, които се предават заедно с болестта в семейства с две или повече засегнати лица. Генетична скаченост определя два физически близко разположени локуса върху дадена хромозома, които показват тенденция по-често да се унаследяват заедно, отколкото ако се предават независимо по време на мейоза. Скачеността се отнася за локуси (не за алели) и се оценява на базата на фамилни изследвания. От друга страна, колкото по-близко са разположени два локуса върху една хромозома, толкова по-малка е вероятността да бъдат разделени от кросинговър по време на мейозата и толкова по-висока ще е степента на скаченост между тях. В човешкия геном има точки, в които кросинговърът протича по-често (горещи точки) и такива, в които той е рядкост [193].

Възможно е да се скринира целия геном за наличието на такива региони като се използват относително малко равномерно разпределени генетични маркери (около 300). Анализът за скаченост има потенциала да локализира болестните гени по хромозомната позиция без предварително познаване на етиологията на заболяването. За съжаление, въпреки че анализът за скаченост е напълно подходящ за откриване на гени с голям ефект при генетично прости разстройства, силата му да открива гени с умерен до слаб ефект, които стоят в основата на мултифакторните заболявания е ограничена. Анализът за скаченост е сред основните подходи за позиционно картиране на кандидат хромозомни райони, обхващащи голям брой гени. Това налага по-задълбочен анализ с помощта на асоциативни проучвания за откриване на истинския кандидат ген[180, 181].

Недостатъци на анализа за скаченост са необходимостта от познаване на точния модел на унаследяване на патогенния локус, ограничените възможности за откриване на гени с малък или среден ефект, ниската продуктивност на метода, генетичната хетерогенност и ниската пространствена разделителна способност [181, 194, 195].

Проучванията на шизофренията с анализ за скаченост дават противоречиви резултати като липсва повторяемост между отделните изследвания. Въпреки това данните от повече от 30 цялостни геномни изследвания са довели до разкриването на няколко потенциални кандидат гена [4, 16, 188, 196]. Геномните региони с най-голяма значимост са 2q, 8p, 13q, и 22q. Не толкова строги критерии на значимост покриват 5q, 3p, 11q, 6p, 1q, 22q, 8p, 20q, и 14p регионите [197] (Фиг. 3).



Фигура 3. Идеограма, показваща основните хромозомни региони и съответните гени в резултат от анализи за скаченост [1].

6.3.2. Асоциативните проучвания

Асоциативните проучвания се базират на разлики в алелната честота между пациенти и контролни индивиди. Асоциативни проучвания имат много по-висока пространствена резолюция от изследванията за скаченост и може да се използват за търсене на специфични рискови гени или алели. Освен това, асоциацията е по-силна отколкото при анализа за скаченост [198]. Изследванията на кандидат гени използват маркери за асоциация в определени гени, за които се знае, че участват в етиопатогенезата на заболяването. Асоциативни проучвания може да се използват за финно картиране на установени в резултат на анализ за скаченост региони [1, 177]. Връзката между заболяването и изследвания алел може да е директна -

идентифицираният алел е патологичния, или индиректна - алелът се намира в непосредствена близост и неравновесна скаченост с действителният „причиняващ болестта" алел [178].

За провеждането на асоциативно проучване е необходимо да се изследват голям брой ДНК проби – пациенти и контроли. Най-често се търси асоциация между полиморфни маркери около и в определен кандидат ген и заболяването. Полиморфните маркери могат да се подберат от публично достъпни бази данни, а кандидат гените – на базата на тяхната позиция в кандидат хромозомен регион или биологичната функция на кодирания генен продукт [181]. Асоциативните проучвания са подходящи при търсене на гени с малък и среден ефект. Те биват два основни вида: популационно-базирани (тип „случай-контрола") и фамилно-базирани. При асоциативните проучвания тип „случай-контрола", се сравняват алелните и генотипните честоти между болни индивиди и здрави контроли от една и съща популация. Основния тип при фамилно-базираните асоциативни проучвания е изследването на триоси (семейства, съставени от пробанд и родителите му), при които се генотипират известен брой генетични маркери, по отношение на които родителите трябва да са хетерозиготи [1, 177, 199].

Повече от 900 гени са били тествани при шизофрения [200]. По-голямата част от изследваните пациенти са от европейски и източно-азиатски произход. Първите гени, идентифицирани с помощта позиционно клониране са в 6p и 8p региони на скаченост. Дистробревин-свързващ протеин 1 (*DTNBP1*) [201] и неурегулин-1 (*NRG1*) [202] са идентифицирани в ирландските и исландските популации. След това те са тествани и повторени в много други проби [203, 204]. Тези резултати не успяват да се повторят при всички изследвания при различни популации. Последни мета-анализи на 32 проучвания на *DTNBP1* показват наличие на различни асоциативни субпопулации, които не могат да се обяснят с етническата принадлежност [203].

Идентифицирани са и няколко други гени в региони на скаченост и след това са повторени в много проби. Регулатор на G - протеин сигнализация 4 (*RGS4*) [205] и неурегулин-1 (*NRG1*) [204] и двата са подкрепени от мета -анализи на асоциирани хаплотипове, но не и отделни SNP. G72/G30 е подкрепен от мета - анализ, изследващ индивидуални SNPs в европейски и азиатски популации [206]. Мета -анализ на девет проби от централно-европейски произход демонстрира относително хомогенна асоциация на 10 SNPs в disrupted in schizophrenia 1 (*DISC1*) [207]. Въпреки че не е

открит с помощта на асоциативно картиране, *DISC1* се намира в региона 1q42, който е свързан с шизофрения в няколко други изследвания [208, 209]. Асоциацията на този ген се подкрепя не само от други асоциативни проучвания, но също така и от невробиологични изследвания. Той взаимодейства с *PDE4B* и заедно участват в cAMP сигнализацията [210]. Животински модели на понижена експресия на *DISC1* са свързани с аномалии в мозъчни структури и съпътстващи поведенчески дефицити, напомнящи шизофренен фенотип [211, 212]. Други гени като *Akt1* [213] и катехол - О - метилтрансфераза (*COMT*) [214] са показали асоциация в някои изследвания. В последващи проучвания тези резултати не са потвърдени [215].

При търсене на кандидат гени са изследвани >800 гена за асоциация с развитие на шизофрения [216, 217]. Тези изследвания показват участие на *DISC1* [208, 218, 219], *NRG1* [202, 220-226], *DTNBP1* [201, 227-229], *RGS4* [230-232], *KCNH2* [233], *COMT* [234, 235], *AKT1* [236, 237], *DRD2* [238-241], *HTR2A* [242] при появата на заболяването. За съжаление нито една от тези находки не се повтаря във всички изследвани кохорти. Ефекта на тези предполагаеми гени към предразположение към шизофрения е много малък при всички случаи и никога не обяснява повече от няколко процента от случаите на заболяването [243].

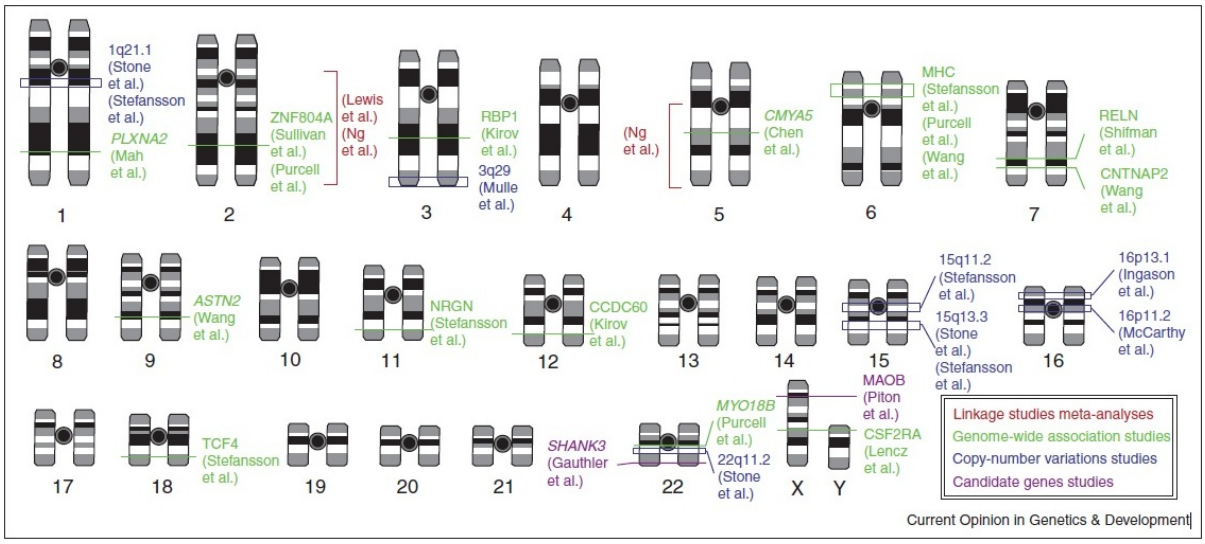
6.3.3. Цялостни-геномни асоциативни проучвания

Цялостното геномно асоциативно проучване позволява търсене на асоциация между дадено заболяване и ДНК полиморфни маркери из целия геном, чрез сравняване на „случаи” и „контроли” без предварителни познания за позицията или функцията на кандидат гени или патогенезата на заболяването.За да се обхване целия геном средно са необходими около 500 000 маркера. Благодарение на създаването на цялостна-геномна хаплотипна карта, съдържаща 3,1 милиона еднонуклеотидни полиморфизма и въвеждането на високо продуктивни, лесни и относително евтини генетични техники е станало възможно въвеждането на цялостни-геномни асоциативни изследвания (GWAS). Това прави възможно изследването на големи групи от пациенти и контроли. GWAS имат способността да откриват гени с малък ефект като едновременно с това определят позицията без да са необходими специални познания за патогенезата на заболяването. Въвеждането на GWAS е довело до откриване на еднонуклеотидни полиморфизми, асоциирани със заболявания като диабет, някои видове рак, ревматоиден артрит, астма и др. [244].

Първоначално асоциативните проучвания са се базирали на изследвания на функционални кандидат гени или позиционни проучвания в резултат от анализите за скаченост. Проведени са хиляди изследвания на функционални кандидат гени, но възпроизводимостта не е голяма. Позиционните проучвания са базирани на анализ на геномни участъци предположени при анализите за скаченост. Тези изследвания предполагат по-голям успех [16, 245]. В последствие са проведени няколко фокусирани върху шизофренията цялостни геномни асоциативни изследвания, които анализират генетичната предразположеност в целия човешки геном.

От тях само две GWAS изследвания докладват значими разлики, докато останалите не успяват да детектират истински кандидат гени [246-251] От тези две изследвания най-важни са асоциациите с MHC региона [247] и ZNF804A [252] протеина, въпреки че коефициентът на относителен риск е 1.09. Някои от последвалите мета анализи [253, 254] и изследвания на случаи и контроли [255] подкрепят първоначалните открития на GWA изследванията. В някои от случаите резултатите само частично се припокриват (напр. само асоциация при женски пол [256]). Най-силните кандидат гени са: *NRG1*, *DTNBP1*, *DISC1* и *DAOA* и гени, кодиращи белтъци, засягащи функцията на глутаматните синапси [180, 257].

За момента няма асоциативни проучвания, които да съобщават за вариант в последователността, който директно да причинява аминокиселинна замяна, промяна на рамката на четене или промяна в експресията и директно да води до биологичен дефект, обясняващ симптомите на заболяването. GWAS обикновено използват по-плътно разположени маркери сред целия геном отколкото проучванията на кандидат гени. Резултатите от GWAS не подкрепят по-рано асоциираните кандидат гени. Те откриват по-рано неподозирани гени и интергенни региони (Фиг. 4) [186].



Фигура 4. Обобщена схема на основните генетични изследвания при шизофрения. В червено са обозначени локусите, открити с цялостни-геномни анализи за скаченост. В зелено са маркирани резултатите от GWAS проучванията. Със син цвят са отбелязани вариациите в броя копия, а с розово – изследванията на кандидат гени [258, 259].

Първоначалните цялостни-геномни изследвания са включвали по-малък брой случаи и контроли (<2000 индивида) и по тази причина не са много достоверни. Някои от изследванията са провеждани върху сборни ДНК проби. Различни проучвания са докладвали асоциация с *PLXNA2, RELN, CCDC60, CSF2RA, ZNF804A, NOTCH4, NRGN, TCF4, MHC* [4 5 6 7 8 -21] Някои от тези проучвания показват полово-специфични разлики. Нито един от тези гени не се потвърждава във всички последващи GWAS анализи. При мащабно изследване на 17 198 пациента и 11 380 контроли докладват за асоциация на *CMYA5*, който директно взаимодейства с *DTNBP1* [25; 26].

По отношение на българска популация е проведен анализ на сборни ДНК проби, показващ асоциация с *CCDC60, RBP1, DRD2, HHAT, NOTCH4, AHCYL2* [260].

6.3.4. Цитогенетичен анализ на хромозомни аберации

Цитогенетични хромозомни аномалии – това е третия подход за идентифициране на гени, водещи до предразположеност към мултифакторно заболяване. Цитогенетични аберации като транслокации и делеции могат да доведат до:

- директно разкъсване на един или няколко гена;

- формиране на нов ген, вследствие на фузията на два други гена, които нормално са пространствено разделени;
- косвено разрушаване на функцията на съседни гени поради позиционния ефект;
- промяна в генната доза при делеции, дупликации и небалансирани транслокации.

В сравнение с SNP хромозомните аберации са по-трудни за изследване. С помощта на микроскопски анализ (разделителна способност 5-10Mb) или флуоресцентна ин ситу хибридизация могат да се открият само големи преустройства. С навлизането на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация става възможно скринирането на целия геном за промени в броя копия, като субмикроскопски делеции и дупликации (CNVs). В последствие се оказва, че тези вариации в броя копия се срещат с голяма честота в общата популация и е необходим по-чувствителен метод като SNPs микрочиповете [261]. Тези нови техники с резолюция < 200kb се прилагат успешно при изследване на болести, свързани с проблеми в развитието, вродени малформации, умствено изоставане и аутизъм [261].

Понякога установяването на хромозомни аберации при индивиди, засегнати от генетично заболяване може да помогне да се картира патологичния ген. При много моногенни заболявания този подход е позволил локализирането и идентифицирането на мутантния алел. Ако при сравнително голям брой индивиди с едно и също мултифакторно заболяване се установи еднаква хромозомна аберация, може да се допусне, че засегнатият локус съдържа важен за патогенезата на болестта ген. Така освен с помощта на анализ за скаченост, някои позиционни кандидат гени за мултифакторни заболявания могат да бъдат идентифицирани и посредством хромозомен анализ [181].

Докладвани са множество хромозомни аномалии при шизофрения, но само някои имат убедително участие в етиологията на заболяването [262]. Установено е, че балансирана реципрочна транслокация между хромозоми 1 и 11 ко-сегрегира с шизофрения и други психиатрични заболявания при една голяма шотландска фамилия. Транслокацията води до разкъсване на два гена с неизвестна функция на хромозома 1 -

DISC1 и *DISC2*. *DISC1* участва в множество невронални пътища [245]. Вариации в *DISC1* са докладвани за асоциация с шизофрения и от асоциативни проучвания.

Установена е асоциация между велокардиофациален синдром (VCFS, синдром на DiGeorge) и шизофрения. При VCFS е установена малка интерстициална делеция в 22q11. Фенотипа при пациенти с VCFS варира като се наблюдава повишен риск от психози, особено шизофрения [263]. Някои анализи за скаченост също предлагат 22q региона като потенциален кандидат за асоциация със заболяването.

Проучвания на вариации в броя копия с високо-резолютивен микрочипов анализ е показало отклонение за *NRXN1* и *MINT2* [264]. Предполага се, че субмикроскопските промени в броя копия са представени в по-голяма степен при пациенти с шизофрения, особено при пациенти с ранно начало и когнитивни увреждания. Промените в броя копия могат да се прилагат само към много малък брой от случаите [186, 258].

Някои автори докладват, че големи делеции (>1 Mb) се срещат с много по-голяма честота при пациенти с шизофрения спрямо здрави контроли [265, 266]. Като най-вероятни кандидати се считат делеции в 1q21.1 [267-269], 15q11.1, 15q13.3 (*CHRNA7*) [267, 270], 22q11 [265, 271], 16p11.2 (асоциира се и с интелектуална недостатъчност, аутизъм и дефицит на вниманието) [272-274]. Делецията в 2p16.3 засяга промотора и първия екзон на *NRXN1*, докато в друго изследване са засегнати екзони 8–10 [264]. CNV, засягащи *NRXN1* асоциират с постсинаптичната диференциация на дендритите [275-277].

Дупликации се откриват в различни екзони на *NRXN1* [278], 16p13.1 [265, 279, 280], chr16p11.2 [266].

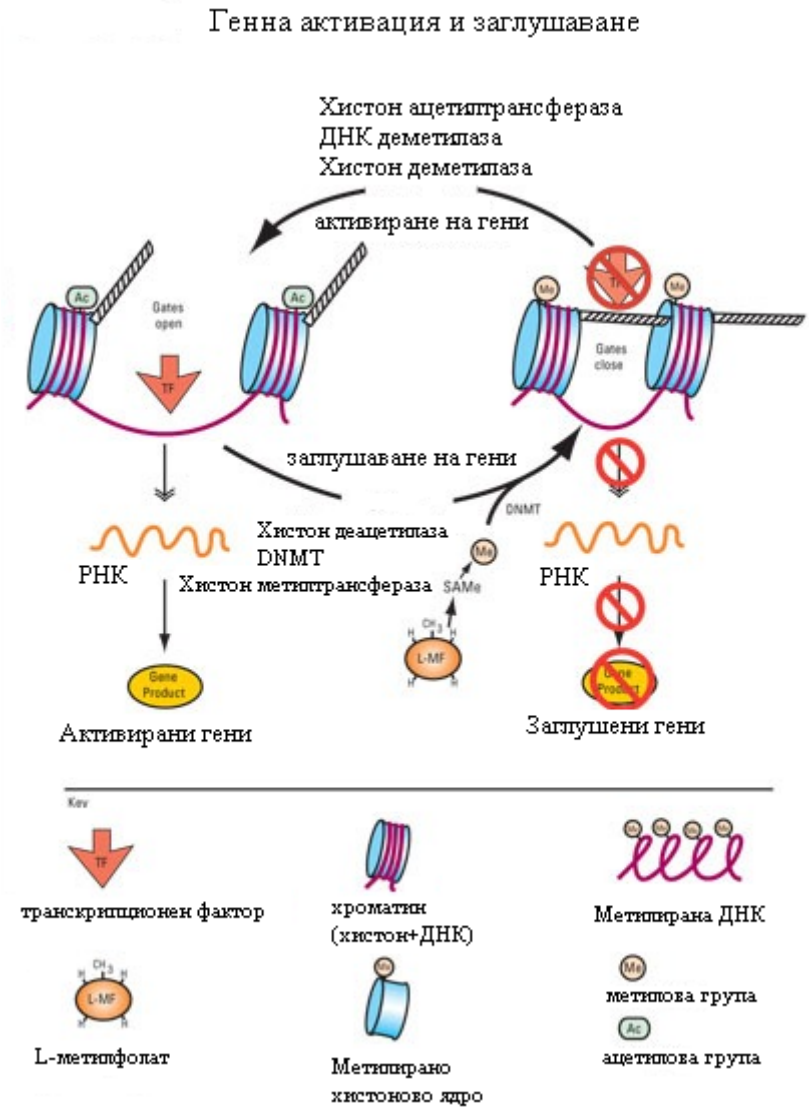
Някои автори откриват делеции и дупликации в 20% от пациенти с шизофрения с ранно начало в сравнение с 15% от случаите с късно начало и 5% при контролите [281]. Изследваните CNV-тата засягат chr2q31.2–q31.3, chr2p16.3, chrYq11.221 и 16p11.2. Други автори не установяват асоциация на CNV-тата с развитието на шизофрения [282].

Установено е, че изследванията на кандидат гени и GWAS изследванията не могат да осигурят силно доказателство за хипотезата ‘общо заболяване, общ вариант’. Следващия етап в изследването на шизофренията е базиран на хипотезата ‘общо

заболяване, множество редки варианти'. Тя се състои в определяне на вариации в броя копия (ДНК делеции и дупликации с размер от около една килобаза до няколко мегабази). Установено е, че тези варианти са много по-чести при пациенти с шизофрения отколкото при здрави контроли [271, 281]. За съжаление също както и предишната хипотеза и тази не успява да даде причина за наследствеността при повечето от случаите с шизофрения. Не се очаква да доведат до успех и опитите за цялостно геномно секвениране. Предполага се, че изследването на големи групи от пациенти също няма да помогне. Това е доказано при изследването на телесното тегло, чиято наследственост също е около 80% [283]. Проблема със заболяването е в неговата биологична комплексност, а не недостатъкът на техническите методи за идентифициране на основните фактори за генетична предразположеност. Вече се приема, че изследването на генетиката на шизофренията няма да успее да определи основните гени на предразположеност, потенциални гени за прицелна терапия или надеждни генетични тестове за предсказване развитието на заболяването. Генетиката е толкова разнородна, толкова сложна, че генетичната предразположеност на всеки индивид (заедно с влиянието на околната среда и трудната за поставяне клинична диагноза) ще направи изключително трудно обобщаването на заключения от индивидуалните пациенти за всички шизофреници.

7. Епигенетика

Епигенетиката е наука, изучаваща наследствените модификации свързани с регулацията на генната експресия, които не водят до промяна на ДНК последователността (Фиг.5) [284].



Фигура 5. Молекулните механизми**,** свързани с активиране на генната експресия включват ацетилиране и/или деметилиране на хистоните, което позволява свързването на транскрипционните фактори. Гените се инактивират при деацетилиране и/или метилиране в резултат на прехвърляне на метилова група от L-метилфолат. Това предотвратява свързването на транскрипционните фактори и съответно заглушава генната експресия [285].

Въз основа на доказателства от няколко изследователски направления е прието, че генетичните и факторите на околната среда играят важна роля в етиопатогенезата на шизофрения. Точното естество на тези два основни етиологични фактора, техния модел на взаимодействие, както и техните патогенни механизми не са добре установени, въпреки задълбочените невробиологични, клинични, генетични и епидемиологични

изследвания [286]. Факторите на околната среда сами по себе си не са достатъчни за развитието на шизофрения. Необходимо е взаимодействие с основната генетична предразположеност. Неправилната епигенетична регулация на генома и прякото увреждане на ЦНС вероятно са основният механизъм за осъществяване на въздействието на пренаталната околна среда (например, вируси, етанол, или хранителен дефицит), докато постнаталните рискови фактори (например, стрес, урбанизация, употребата на канабис и др.) също могат да повлияят на риска чрез регулиране на уязвимите пътища в ЦНС, участващи в шизофрения [286].

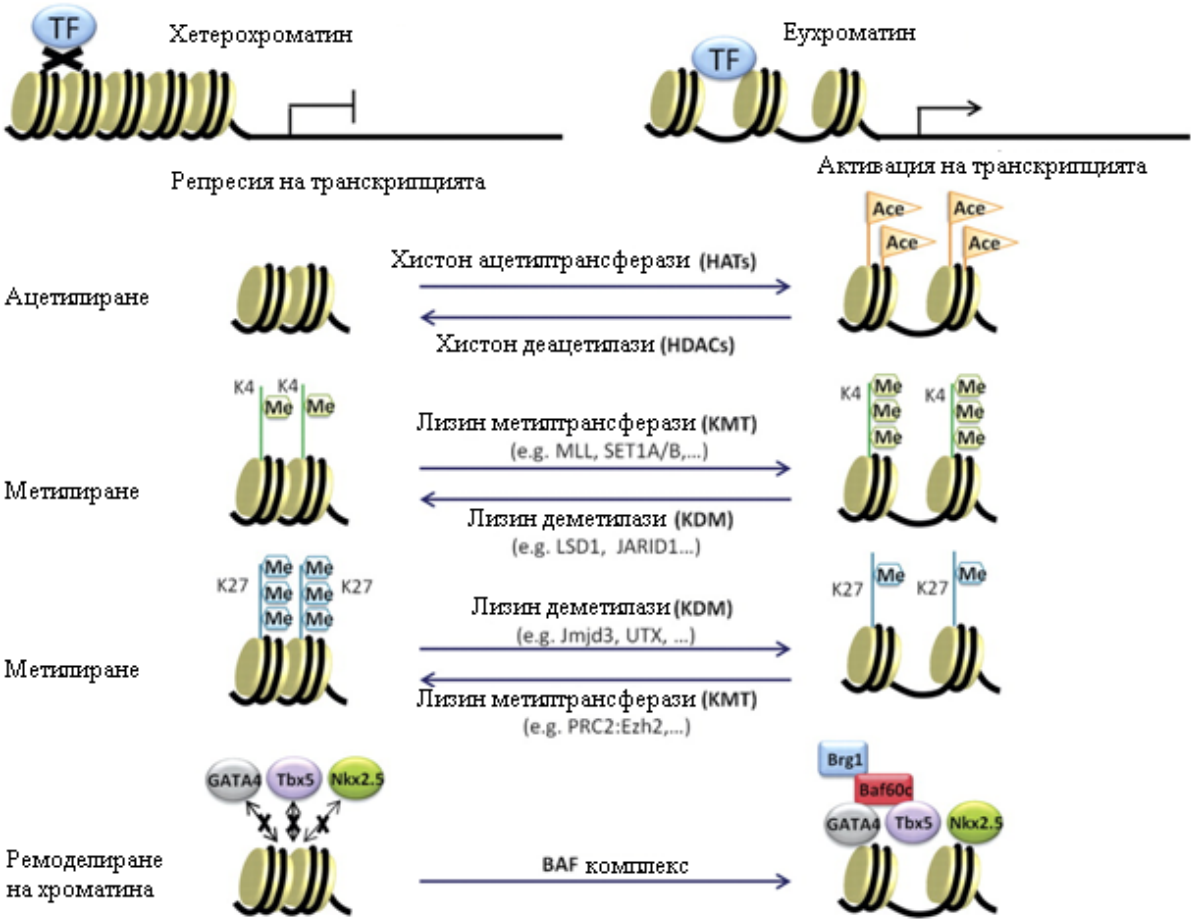
Последните постижения в епигеномиката са подпомогнали разбирането на взаимодействието на гените и околната среда чрез идентифициране на молекулярните механизми, които опосредстват влиянието на околната среда върху генната експресия и активност. Тези епигенетични открития са от основно значение за концептуализация на комплексни мултифакторни психиатрични разстройства като аутизъм, биполярни разстройства, шизофрения и т.н. Неправилна епигенетична регулация в отговор на различни фактори на околната среда е потенциален механизъм, обясняващ увеличаващия се риск от развитие на шизофрения в зряла възраст [287].

Епигенетиката се фокусира върху промени в генната функция, унаследени чрез митоза и мейоза, които не включват промени в ДНК последователността. Гените са епигенетично маркирани (активирани или заглушени) по време на гаметогенезата (например, генен импринтинг, който позволява да се експресира алел само от единия родител) и ембриогенезата (когато се поставят епигенетични "инструкции" за онтогенетичното развитие), по-късно в живота, в отговор на влиянието на околната среда или в резултат на случайни събития [288]. Най-често, генната експресия се регулира на ниво транскрипция, чрез ковалентни модификации на генни промотори, или след транслация, чрез ковалентни модификации на хистонови опашки, водещи до ремоделиране на хроматина. По-специално, метилиране на 5' цитозин в ДНК последователността на генни промотори нарушава свързването на транскрипционни фактори и обикновено понижава генната експресия, въпреки че напоследък има доказателства, че определени модели на метилиране на генни промотори може също и да активират гени [289, 290]. Посттранлационна регулация на генната активност се постига посредством динамични модулации на хроматиновата структура. ДНК е увита около комплекс от хистонови белтъци ("нуклеозоми"), където тя е достъпна (слабо

пакетиран - "еухроматин") или недостъпна (плътно опакован - "хетерохроматин") за транскрипционни фактори и РНК полимерази. Ацетилиране на лизин в хистоновите опашки разхлабва структурата на хроматина и улеснява генната транскрипция чрез създаване на отрицателно заредени амидни групи, които отблъскват отрицателно заредена ДНК фосфатна група ("еухроматин"). Обратно деацетилиране на лизин създава положително заредена амино група със силно привличане към отрицателно заредения ДНК-фосфат, затягайки хроматиновата структура ("хетерохроматин") и в резултат води до намалена генна експресия.

Последователното подреждане на гените по дължината на ДНК последователността и пространствената ко-локализация с транскрипционни фактори оптимизира функционирането на ко-регулираните гени. По-специално, силно транскрибираните гени, РНК полимерази и транскрипционните фактори се събират в отделни пространствени центрове наречени "транскрипционни фабрики" [291]. Прекъсване на тази пространствена геномна организация чрез алостерични промени в хроматиновата конформация води до потискане на участващите гени [292].

В допълнение към прякото засягане на генната транскрипция от ремоделирането на хроматина, както е описано по-горе, хроматиновата структура и генна активност се синхронизират чрез двупосочно съвместно регулиране: метилираната, неактивна ДНК събира ензими, които променят конформацията на хроматина в неактивен хетерохроматин [293]. Обратно, активния еухроматин събира ензими (например, хистон ацетил трансфераза - HAT), които водят до хиперацетилиране на хистоновите опашки, деметилиране на ДНК и генно активиране [294, 295]. Дългосрочният модел на епигенетично модулирани гени създава епигенома (или така да се каже "програмирания" геном) (Фиг.6).



Фигура 6. Епигенетични механизми за регулация на генната експресия.

Епигенетичната модулация на генна активност е добре установен молекулен механизъм опосредстващ различни видове влияния на околната среда. Пример за регулация на генната експресия в резултат от външни фактори, осъществен с помощта на епигенетични промени е изследването на ефекта от грижите за потомството при животни. Майчините грижи в ранна възраст регулират генната експресия, което води до стабилни модели на експресия на глюкокортикоидния рецептор в хипокампуса, променлива податливост към стрес, както и броя на свързаните с тях характеристики на поведение при възрастно потомство [295-297]. По същия начин, хората със зависимост към определени вещества показват повишено метилиране и понижена експресия на глюкокортикоидни рецептори в хипокампуса и дългосрочната податливост към стрес [298]. Лоша, както и прекалена грижа от страна на майката в детството повишава риска от депресия, зависимости, дефицит на вниманието, обсесивно-компулсивно разстройство, тревожни разстройства и антисоциални черти в зряла възраст [299]. Докладвана е значителна линейна отрицателна корелация между нивата на

кортикотропин освобождаващ фактор в цереброспиналната течност и родителските грижи [300]. Обратното, добра майчина грижа корелира с намалена тревожност и намалени нива на слюнчен кортизол в отговор на стрес [301].

Динамичната структура на хроматина осигурява връзката между външната среда и генната експресия и активност [295, 297, 299]. Това се отнася не само за химични или биологични патогени на околната среда [296, 302], но също така за психосоциални експозиции [303, 304]. Епигенетични характеристики, установени в ранна възраст имат свойството да бъдат стабилни, но са обратими, дори и в зряла възраст, чрез постоянни ефекти на променяща се среда [296, 303].

Генната предразположеност към влияния на околната среда продължава през целия живот, дори и в зрели, диференцирани соматични клетки. Например, 3 годишни монозиготни близнаци са приблизително конкордантни за степента на ДНК метилиране и ацетилиране на хистони в периферни кръвни лимфоцити и други не-нервни тъкани, но на възраст от 50 години те са натрупали четирикратна разлика [305]. Близнаци, отраснали по отделно проявяват по-големи различия в ДНК метилиране от близнаци израснали заедно, което показва, че излагането на различна околна среда, а не стохастични ефекти, създават разликата [305-307]. Генетичната предразположеност към влияния на околната среда осигурява възможности за стратегии за превенция и лечение на множество заболявания, вкл. и психиатрични. Погледнато от отрицателната страна, епигенетични механизми отварят вратата за патогени от околната среда да стигнат до ядрото на клетката и променят генома или чрез усилване на съществуващата, или чрез създаване на нова генетична предразположеност [286].

По отношение на генетичните промени, епигенетичните механизми са бързи (те осъществяват остра регулация на генната активност в отговор на околната среда), засягат само избрани тъкани и клетъчни типове (генетичните промени засягат всички видове клетки), и осигуряват механизъм за не-геномно "Lamarckian" унаследяване или унаследяване на придобитите белези (информация за околната среда може да се предава през поколенията чрез непълно отстраняване на епигенетичните характеристики в герминативните клетки) [308]. Епигенетичните механизми осигуряват пластичност в програмирането на развитието и бързо адаптиране към влиянието на околната среда, което се е развило, за да увеличи шансовете за оцеляване и възпроизводство при променливи условия [309].

7.1.Молекулярни сигнали в епигенетичната регулация

Информацията в клетките се предава към следващото поколение освен чрез генетични и чрез епигенетични механизми. Генетичната информация е закодирана в последователността на ДНК, докато епигенетичната информация се определя основно от модификация на ДНК (ДНК метилиране) и модификации на хроматина (метилиране, фосфорилиране, ацетилиране, убиквитиниране и сумоилиране на хистоните). Комбинацията от тези модификации характеризира хроматиновата конфигурация и достъпността на транскрипционната машина до гените като по този начин се осъществява транскрипционно регулиране на генната експресия. Инициирането и контролирането на транскрипцията се регулира чрез промоторите, специфичните транскрипционни регулаторни фактори, посттранслационните модификации на хистоните и пострепликационните модификации на ДНК. Те определят конфигурацията на хроматиновата структура и ДНК и осигуряват достъп на транскрипционната машина [310-313].

7.1.1. Основни епигенетични регулаторни механизми

Комплексната епигенетична регулация се състои от няколко молекулярни сигнала, които насочват експресията на гени, въз основа на промените в околната среда и етапа на развитието. Транскрипционни фактори, не-кодиращи РНК-и, ДНК метилиране, модификация на хистоните и ремоделиране на хроматина са такива епигенетични сигнали, които медиират достъпността до ДНК последователността и експресията на гените, когато е необходимо [314]. Транскрипцията се контролира основно от цис-действащи и/или транс-действащи регулаторни механизми [315]. Епигенетичната регулация се осъществява чрез взаимна връзка между ДНК метилиране и модификации на хистоните [316]. ДНК метилирането има подсилващ сигнал за други регулаторни механизми, чиито функции не са толкова силни [315].

ДНК метилирането и хистоновите модификация са два важни механизма за модулиране на структурата на хроматина и регулиране на експресията на гените [317]. Епигенетичната регулация е сложно явление, което участва в различни процеси [318], като импринтинг [319], инактивиране на Х хромозомата [320] и генно заглушаване [321, 322]. Тя участва в ембрионалното развитието [323], образуването на плацентата [324], ядреното препрограмиране [325] и карциногенезата [326].

7.1.2. Транскрипционна регулация

Транскрипционната регулация на гените се определя от различни механизми. Те включват геномния метилационен профил [318], хроматинова конфигурация [327], хроматинови структурни вариации (еухроматин и хетерохроматин) [328], и хроматинови модификации [329]. Модификациите на хроматина включват метилиране, ацетилиране и фосфорилиране, както и polycomb белтъци [330] и др. Транскрипционната регулация се контролира главно от модела на геномно метилиране. ДНК метилиране на специфични CpG динуклеотиди, разположени в клъстери (CpG острови) е регулаторния механизъм, чрез който се активира или потиска генната експресия [331]. Освен това, химичните модификации на хроматиновите хистонови ядра са подпомагани от метилиране на ДНК в CpG острови [332]. Различните епигенетични модификации имат взаимна връзка по между си [333]. Герминативните клетки и ембриоталните клетки по време на ранното развитие са два етапа, където метилационните модели се изтриват, установят и възобновяват [334].

7.1.3. Епигенетични характеристики на ДНК метилирането

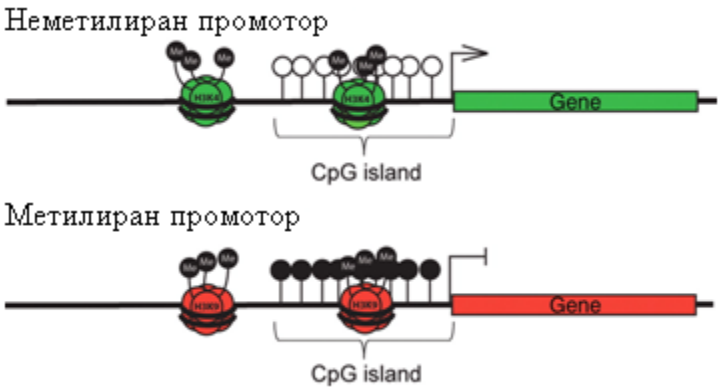
Метилирането е основна епигенетична модификация на ДНК, свързана с процеси на нормалното развитие, геномния импринтинг, заглушаване на едни гени и експресия на други, стабилност на хроматина и др. Метилирането представлява добавяне на една метилова група в 5’ позиция на цитозиновия пръстен (Фиг. 7) [335].



Фигура 7. Метилиране на цитозин.

При гръбначните животни ДНК метилирането е съсредоточено в богати на цитозин и гуанин райони (CG – райони), наречени CpG – острови (където честотата на "CG" последователностите е по-висока, отколкото в околните региони). При соматични

клетки, CpG островите обикновено са хипометилирани, разположени в 5' края на много гени, а често и в промоторните региони [336]. Около 60% от всички генни промотори имат CpG острови [337]. По време на индивидуалното развитие, някои острови се метилират и се свързват с комплекси, потискащи асоциираните с тях генни промотори. Така в резултат от промененото метилиране на CpG островите се променя и генната експресия, което корелира с развитието на редица канцерогенни процеси, мултифакторни заболявания или прогресия на болестта. По тази причина изследването на метилационния профил може да доведе до изясняване на патологията и прогресията на различни заболявания, ефекта от лечението и идентифициране на епигенетични маркери. През 2002 година са разработени критерии за коректното дефиниране на CpG острови. Според тези критерии най-вероятните кандидати за CpG островите са с дължина по-голяма от 500bp, асоциирани с приблизително 70% от промоторите при хора [338-340]. Характеризират се със съдържание на GC над 55% и наблюдавано спрямо очаквано отношение на CpG островите повече от 65%. По този начин от CpG островите са изключени геномни секвенции, богати на GC, като Alu-повторите и се установи, че в човешкия геном има около 28,500 CpG – острова [341], като CpG – островите са с дължина 300-3000 базови двойки (Фиг.8).



Фигура 8. Схематично представяне на CpG остров.

ДНК метилиране на CpG последователности потиска експресията на метилираните гени [342]. CpG островите обикновено се намират в повтарящи се елементи като центромерни учатъци, сателитни последователности и рибозомални РНК гени [343]. ДНК метилирането може да се променя по отношение на модела и нивото на глобалното ДНК метилиране и е специфично за стадия на развитие [344] и произхода на тъканта [345]. В действителност, зрелите родителски гамети при

оплождане са значително метилирани. Например, ДНК на сперматозоид в сравнение с тази на яйцеклетката е по- метилирана [346] и претърпява деметилиране след оплождане [347]. Въпреки това, импринтираните гени и някои ретротранспозони предимно остават метилирани. В мишки, е наблюдавано хиперметилиране в повтарящи се региони и хетерохроматинови области; докато в специфични генни участъци от ДНК преобладава хипометилирането [348]. Нарушения в ДНК метилиране на различни повтарящи се елементи в клонирани бластоцисти се съобщава за първи път от Kang и сътрудници [349]. Метилиране на импринтирани, моноалелни експресирани гени [350], от друга страна, е стабилно (не *de novo*) и силно консервативно събитие [347]. Наскоро, в изследване върху хора, сравнение между ембрионални стволови клетки и диференцирани клетки е показало, че има множество метилирани цитозини в региони, различни от CpG островите при ембрионалните стволови клетки [351].

7.1.4. ДНК метилационни сигнали

ДНК метилирането се контролира от два вида сигнали: цис -действащи сигнали и транс -действащи сигнали. *IGF2R, SNRPN, H19* и *RASGRF1* са гени, регулирани от цис - действащи сигнали [352]. Цялостното ДНК метилиране се извършва предимно след оплождането и с различна скорост на деметилиране, която е специфична за всеки родителски геном [342]. Наблюдения върху клетъчния цикъл показват, че бащиното деметилиране обикновено се случва по време на първия клетъчен цикъл, докато майчиното отнема няколко цикъла [353]. След оплождането, метилирането на регионите за контрол на импринтинга (ICRs) се възстановява по зависим от пола начин [342]. Въпреки че модела на метилиране в соматичните клетки се поддържа стабилен, метилационния профил на герминативните клетки трябва да бъде възстановен правилно, за да се предаде в следващото поколение. Това предполага, че метилирането се модулира по зависим от пола начин [354].

7.1.5. ДНК метилационен анализ

Анализ на моделите на метилиране е основният подход в различни проучвания, които се фокусират върху генната регулация. Метилирането на 5’ цитозин предимно се извършва в CpG острови в промоторната област на гена, което води до потискане на експресията на гена. Няколко изследвания показват корелация на анормална форма на ДНК метилиране и проблеми при развитието по време на ембриогенезата [355] и плацентацията [356], както връзка с някои заболявания [357]. Техниките за метилиране

на ДНК обхващат широк кръг от анализи от специфичен ген до цялостно-геномни изследвания. Класифицирани са в четири групи на базата на техниките за анализ на метилиране на ДНК [358]: бисулфитно превръщане, метилационно-чувствителен рестрикционен анализ, методи на базата на обогатяване и методи на улавяне, базирани на афинитета към метилираната ДНК [359].

7.1.6. Регулаторни фактори при метилирането на ДНК – ДНК метилтрансферази

ДНК метилирането е биохимичен процес, при който се добавя метилова група към цитозин или аденин от S-аденозилметионин [352]. Съществуват 2 основни типа ДНК метилиране при еукариотните клетки. Първия тип е де ново метилиране, който участва в пренареждане на модела на метилиране по време на ембриогенезата или диференциацията [360]. Вторият тип на метилиране е свързан с поддържане на вече съществуващо метилиране. Има два класа ензими – метилтрансферази (DNMT-и), които осъществяват процеса на метилиране: де ново метилтрансферази и метилтрансферази за поддръжка [361]. DNMT-ите са транс-действащи фактори, насочени към местата за метилиране на ДНК с помощта на цис-действащи сигнали. Има редица DNMT-и при бозайници (виж Таблица 1), които са били идентифицирани от 1980 [362].

Видове ДНК метилтрансферази и техните функции	
DNMT-и	**Функции**
DNMT1	Поддържа метилационния статус, участва в процесите на репликация и репарация, от значение за метилирането *de novo*
DNMT2	Участва в метилирането на ДНК и РНК
DNMT3a	Установява моделите на *de novo* метилиране, особено при гаметогенезата
DNMT3b	Установява моделите на *de novo* метилиране
DNMT3L	Значение за *de novo* метилирането, повишава *de novo* метилационната активност на DNMT3a и DNMT3b, установява моделите на *de novo* метилиране, особено при гаметогенезата

Таблица 1. Видове ДНК метилтрансферази и техните функции [318, 363-365]

ДНК метилиране на петия въглероден атом в цитозина се катализира от ДНК метилтрансферази - DNMT. Това семейство на ензими е от голямо значение за епигенетичната регулация, тъй като модулира експресията на гени, особено импринтираните, както и инактивиране на Х хромозомата [366]. Има пет основни типа DNMT-и, които участват в *de novo* и/или поддържане на ДНК метилирането: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L [362]. DNMT1, DNMT2 и DNMT3 са най-добре характеризираните DNMT-и. DNMT1 е метилтрансфераза за поддръжка като метилира както импринтирани, така и не- импринтирани гени. DNMT2 има регулаторна роля при ДНК метилирането, но механизмът и ролята му за поддържане или *de novo* метилирането остава неясен. И двете DNMT3a и DNMT3b са от съществено значение за *de novo* метилирането и нямат отношение към поддръжка на метилирането [367]. DNMT3 като *de novo* DNMT (DNMT3a) е ключов фактор в метилирането при импринтинг. Предполага се, че нейните изоформи имат значение за цялостното ДНК метилиране в герминативни клетки [368].

Dnmt3L се определя като регулатор на импринтинга за ДНК метилиране чрез регулиране на DNMT3a/b [369]. Експресията на *DNMT1* гена показва положителна корелация със ДНК метилационния статус на сателитния регион I. Метилтрансферазите са отговорни за метилирането на контролния импринтинг регион (ICR). Освен това транскрипционен анализ на pS2/TFF1 през клетъчния цикъл показва, че DNMT-ите извършват две отделни действия, а именно метилиране и деметилиране на CpG островите [370]. Dnmt3L има стимулираща роля по отношение на DNMT3a и DNMT3b [369] и установяване на метилирането [342]. В човешката плацента DNMT1 е потисната за разлика от DNMT3L като това потвърждава участието на семейството на DNMT в установяването на *de novo* ДНК метилиране в екстраембрионалната тъкан [371]. Нов сплайсинг вариант на DNMT3b - DNMT3B3Δ5, е силно експресиран в плурипотентни ембрионални стволови клетки, докато по време на диференциацията е потиснат [372]. При изследване на DNMT-ите значителното понижаване на експресията на DNMT3a, DNMT3b и DNMT1 в резултат от microRNA-29b води до цялостно хипометилиране [373]. Dnmt3L сама по себе си няма метилтрансферазна активност; но асоциацията и с семейството на DNMT3 е от значение за *de novo* метилирането при мишки [374]. Има данни за участието на DNMT1 в метилирането както на не-CpG региони [375] така и на CpG острови [318, 376]. Хистоновите модификация и пространственото разпределение

на CpG са в състояние да насочат диференциалното метилиране на импринтираните гени [318].

Кристалографски анализ е показал, че *de novo* метилиране на ДНК може да се контролира от специфични модификации на хистоните, при което хетеротетрамерната структура, съставена от DNMT3a и DNMTL, осигурява две активни CpG места, които са на разстояние 8-19 базови двойки едно от друго [377-379]. Проучване върху хромозома 21 затвърждава критичната роля на отстоянието на CpG за ДНК метилирането [380]. Активното деметилиране в генома на бозайниците изглежда обещаващо, но няма данни за ензими, които могат да катализират тази реакция [381]. Някои изследвания докладват активен процес на деметилиране, независимо от ДНК репликацията [382, 383]. Деметилирането на бащините алели е активно събитие, което се случва бързо след оплождането. Майчиния геном, обаче се деметилира през първите клетъчни цикли, в които деметилирането изглежда да е неактивен процес.

7.2.Метилационно профилиране на заболявания

Доказано е, че промени в различни епигенетични пътища са от значение при развитието на социално-значими заболявания при човека като нарушения в развитието, сърдечно-съдови заболявания, диабет тип 2, затлъстяване и безплодие.

7.2.1. Модификации в ДНК метилационния профил при стареене

ДНК метилирането намалява с възрастта на клетките. Едноайчните близнаци не се различават епигенетично в началните етапи на живота, но има съществени разлики в епигенетичните маркери с напредване на възрастта. Това наблюдение предполага важна роля на околната среда при изграждането на епигенома. Доказано е, че процесът на стареене е свързан с някои епигенетични пътища, които са идентифицирани в процеса на канцерогенезата [384].

7.2.2. Модификации в ДНК метилационния профил при рак

В допълнение към класическите генетични мутации раковите клетки се характеризират със силно променен епигенетичен профил. Раковия епигеном се характеризира с глобални промени в ДНК метилирането, хистонови модификация и променени експресионни профили на хроматин модифициращи ензими [385, 386], които играят важна роля в инициирането и развитието на рак.

Променено ДНК метилиране се наблюдава в ранните стадии на канцерогенезата. Една от най-важните характеристики на промените в раковото метилиране е неговата тъканна и туморна специфичност [387]. ДНК метилационните маркери може да се използват при детекция, класификация, прогноза и отговор към терапия [388].

Раковите клетки се характеризират с обща загуба на ДНК метилиране [389] (20-60% по-малко от общия 5-метил цитозин). Хипометилирането може да доведе до активиране на нормално заглушени райони от генома и следователно експресия на повтарящи се елементи или гени, които нормално биха били заглушени по време на развитието, включително протоонкогени. Често се наблюдава придобиването на специфични модели на хиперметилиране в CpG островите на някои генни промотори. Хипометилиране на сателитната последователност SATR1 често се среща в ранните етапи на развитие на тумор на гърдата [390].

Цялостното хипометилиране се среща главно при повтарящите се последователности като води до хромозомна нестабилност, транслокации, разкъсване на гени и реактивиране на ендопаразитни последователности [389, 391]. Хипометилиране на специфични промотори могат да активират аберантна експресия на онкогени и предизвикване на загуба на импринтинг в някои локуси. Например, *MASPIN* (известен също като *SERPINB5*), тумор-супресорен ген, който е хиперметилиран в епителни клетки при рак на гърдата и простата [392] докато при други видове тумори е хипометилиран. Хипометилиране на *MASPIN* и следователно неговото експресиране, се увеличава със степента на дедиференциация на някои видове ракови клетки [393, 394]. *S100P* при рак на панкреаса, *SNCG* при рак на гърдата и яйчниците и *MAGE* и *DPP6* при меланоми са други добре изучени примери на хипометилирани гени при рак [395, 396]. Най-честия случай на загуба на импринтинг, дължащ се на хипометилиране е *IGF2*. Потенциалната роля на метилирането в развитието и прогресията на рака, както и неговата предиктивна и прогностична стойност са докладвани при много видове тумори, включително на гърдата, на черния дроб, на белия дроб, рак на дебелото черво и др. [397].

За разлика от глобалното ДНК хипометилиране, хиперметилиране се наблюдава при специфични CpG острови. Транкрипционното инактивиране, причинено от промоторно хиперметилиране засяга гени, участващи в основните сигнални пътища: ДНК репарация *(hMLH1, MGMT, WRN, BRCA1),* метаболизма на витамините *(RARB2,*

CRBP1), Ras сигнализация *(RASSFIA, NOREIA),* контрол на клетъчния цикъл *(p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, RB)*, p53 сигнална мрежа *(p14^{ARF}, p73* (известен също като *TP73), HIC-1)* и апоптоза *(TMS1, DAPK1, WIF-1, SFRP1)* и др. [398]. Хиперметилираните промотори имат потенциал като ново поколение биомаркери с голяма диагностична и прогностична стойност [399, 400].

Въпреки че повечето проучвания са фокусирани върху промоторните CpG острови, последните открития предполагат, че повечето от аберантното ДНК метилиране при рак възниква в краищата на CpG островите (например, в *HOXA2* и *GATA2*). Повечето промени в краищата на CpG островите (45-65%) са свързани с региони, които се хиперметилират при нормална тъканна диференциация (например, в *TGFB1* и *PAX5*) [396, 401]. Диференциалното ДНК метилиране в краищата на CpG островите изглежда корелира с генната експресия точно както при CpG островите [402].

Моделите на хиперметилиране са тумор-специфични и все още не е ясно защо определени региони стават хиперметилирани, докато други остават неметилирани. Едно обяснение е, че инактивирането на определени гени дава предимство при растеж, което води до клонална селекция [398]. В някои случаи се предлополага, че аберантно метилиране на CpG-острови може да се дължи на събирането на DNMT-и и HDAC-и към специфични прицелни гени, медиирано от фузионни белтъци, като промиелоцитна левкемия - ретиноева киселина рецептор - α (*PML-RARA*) фузионен белтък, експресиран при някои левкемии [403]. Друга възможност е разпространението на метилирането от силно метилирани последователности към обкръжаващата ги среда, което е по-изразено при рак. Докладвано е, че епигенетично заглушаване в резултат от ДНК метилиране може да се разпространи на 1Mb дълги участъци на хромозомите [404], наподобяващи загуба на хетерозиготност често наблюдавана в човешки тумори. Това глобално нарушаване на модела на ДНК метилиране може също да се медиира от нарушена регулация на DNMT експресията. DNMT1 и DNMT3b са свръхекспресирани в много видове тумори [405].

Друг клас на метилационни промени се характеризира с локално хиперметилиране на индивидуални гени, което е свързано с анормално генно заглушаване. Хиперметилиране-зависимо заглушаване в раковите клетки се съобщава за класически тумор-супресорни гени, ДНК репарационни гени, гени за контрол на

клетъчния цикъл, анти-апоптотични гени и гени, които предотвратяват анормална активност на пътища, свързани с развитието [406]. При пациенти с хронична лимфоцитна левкемия, са идентифицирани 193 нови ДНК последователности с променен метилационен профил [407] и също така, повече от 400 потенциални кандидат гени при пациенти с остра лимфобластна левкемия [408, 409]. Идентифицирани са около 200 диференциално метилирани ДНК локуси с цел разработване на мощни молекулярни методи за диагностика на рак на гърдата. Един от тези гени, *GHSR* подпомага разграничаването на инфилтриращ дуктален карцином на гърдата от нормална тъкан и доброкачествени образования на млечната жлеза [410]

7.2.3. Модификации в ДНК метилационния профил при заболявания, свързани с развитие на нервната система

Централната нервна система е една от най-сложните системи при хора. Различните части на един орган показват различни модели на експресия, а също и един и същ клетъчен тип има различна транскрипционна регулация в зависимост от локализацията му в органа [411]. Приключването на митотичните деления, когато нервните клетки губят своята мултипотентност е ключова стъпка в развитието на нервната система [412, 413], която изисква много прецизна настройка на транскрипцията. Епигенетичните фактори са ключови в тази регулация. Генетични мутации в гени, отговорни за епигенетичните настройки причиняват дисфункции, които водят до някои нарушения в развитието. Класифицират се според епигенетичния механизъм, който е засегант от мутация. Епигенетичния код е от съществено значение за основни процеси в нервната система като синаптична пластичност и поведенчески характеристики като учене и памет [414]. Когнитивните дисфункции в следствие на анормални епигенетични промени водят до индуциране на заболявания, като синдром на Rubinstein-Taybi, синдром на Rett, Синдром на чупливата Х хромозома, болестта на Алцхаймер, болестта на Хънтингтън и психиатрични заболявания като шизофрения, пристрастяване, депресия, и т.н.

Синдромът на Rett е Х-свързано неврологично заболяване, причинено от точкови мутации в MBD протеина MeCP2. Активирането и потискането на MeCP2 в мозъка са свързани с дефекти в развитието на нервната система и синаптичната трансмисия [415]. Предполага се, че MeCP2 функционира като генен заглушител поради набирането на HDAC към метилираната ДНК. Наскоро, са открити нови данни

относно важната роля на MeCP2 в хроматиновата архитектура, регулирането на иРНК сплайсинг [416, 417] и активна транскрипция на гени (например, *Sst, Gprin1*) [289]. Въпреки че, транскрипционни промени са описани в някои гени (напр., *Fkbp5, Mobp, DDC* и *S100A9*) [418], импринтирани региони (напр. *DLX5*) и miRNAs (например, *Mir-184*) [419, 420], липсата на MeCP2 не води до значителни цялостни промени в транскрипционните нива.

7.2.4. Модификации в ДНК метилационния профил при невродегенеративни и неврологични заболявания

По-голямата част от епигенетичните изследвания при невродегенеративни и неврологични заболявания са свързани с метилиране на ДНК и модификация на хистоните. ДНК метилационните профили при много неврологични заболявания са силно променени, което води до хипер- и хипометилирани участъци. Например, хиперметилиране на промотора на *FMR1* е описано при пациенти със синдром на чуплива Х хромозома. Синдромът на чупливата Х хромозома е причинен от експанзия на CGG тринуклеотидни повтори в 5'-нетранслируемия регион на *FMR1*. Експанзията на CGG тринуклеотидните повтори до > от 200 копия индуцира метилиране на *FMR1*, което води до неговото транскрипционно заглушаване [421]. Други случаи на хиперметилирани промотори включват *NEP*, известен също като *MME* при болестта на Алцхаймер, *FXN* в атаксия на Фридрайх и *SMN2* в спинална мускулна атрофия [416].

В развитието и прогресията на болестта на Алцхаймер, факторите на околната среда нарушават генната експресия в дългосрочен план като повлияват взаимодействието на метилирани CpG клъстери в промоторите на специфични гени с метил-свързващи белтъци, като например MeCP2 и SP1. Това нарушение започва в ранните стадии на развитие докато патологичен ефект се появява значително по-късно в живота [422].

От друга страна, при други невродегенеративни и неврологични заболявания са докладвани хипометилирани региони. Например, субстанция нигра при пациенти с Паркинсон свръхекспресира тумор некротизиращ фактор алфа (*TNFα*) поради промоторно хипометилиране, чрез което се предизвиква апоптоза на невроните [423]. Други случаи на хипометилиране са докладвани в промоторната област на *PADI2* при пациенти с множествена склероза [416] и в *Avp* енхансерите на мишки, подложени на стрес в ранни етапи от живота [424]. Промени в моделите на ДНК метилиране засягат

не само генни промотори, но може да доведат до загуба на импринтинг. Класически примери на загуба на импринтинг са Prader-Willi и Angelman синдроми. И двете заболявания включват анормално ДНК метилиране в импринтинг регион в 15q11-q13. Синдромът на Prader-Willi е резултат от загубата на бащини експресирани гени в този регион, докато Angelman синдромът възниква от загубата на майчиния експресиран *UBE3A* ген [425].

7.2.5. Модификации в ДНК метилационния профил при автоимунни, сърдечно-съдови и др. заболявания

Автоимунните заболявания се характеризират с нарушаване на имунния толеранс към специфични собствени антигени. Повечето от изследванията, свързващи автоимунните нарушения и епигенетичните промени се фокусират върху промени в ДНК метилирането. Едно от най-добре проучените автоимунни заболявания - ICF синдром (имунодефицит, центромерна нестабилност и лицеви аномалии) е причинено от хетерозиготни мутации в *DNMT3B*. Пациентите с ICF показват значително ДНК хипометилиране в перицентромерните сателитни 2 и 3 повтори, алфа сателитни последователности, Alu последователности и D4Z4 и NBL2 повтори. От друга страна, пациентите с ICF имат почти непроменени нива на цялостно ДНК метилиране [425, 426], въпреки че няколко гени, регулиращи развитието, неврогенезата и имунната функция имат аберантна експресия [427].

Други автоимунни заболявания, които не са свързани с мутации в ензимите, отговорни за ДНК метилирането, се характеризират с цялостно хипометилиране, какъвто е случаят със системен лупус еритематозус и ревматоиден артрит, подостра кожна форма на лупус еритематозус (SCLE), склеродермия и възпалителни кожни заболявания [428]. Т клетките, отговорни за автоимунния отговор, при пациенти с системен лупус еритематозус имат специфично генно хипометилиране. Различни хипометилиращи агенти могат да индуцират лупус-подобен автоимунитет *in vitro* и *in vivo* [429]. Хипометилираните региони все още не са добре дефинирани, въпреки че някои хипометилирани сайтове са били докладвани. Пациенти, страдащи от системен лупус еритематозус имат ДНК хипометилиране в *PRF1, CD70, CD154, IFGNR2, MMP14, LCN2, CSF3R, AIM2* и други гени, и също в рибозомални РНК генни промотори, 18S и 28S [430]. Механизмите, отговорни за това повсеместно хипометилиране все още не са разкрити. Хипометилирането при системен лупус

еритематозус е частично медиирано от *miR-21* и *miR-148a*, които са насочени към DNMT1 [427]. При ревматоиден артрит са описани не само хипометилирани сайтове (например, в IL-1 и IL-6), но също и хиперметилирани сайтове (например в DR3) [431, 432].

При пациенти с SCLE хипометилирането на ДНК намалява нивата на DNMT1 и DNMT3a mRNA-и и повишава нивата на mRNA на метил-CpG-свързващите белтъци MBD1, MBD3 и MBD4 в CD4+ T клетките. Установени са също повишени нива на mRNA на MECP2 и MBD4 при CD8+ T клетките [433]. Неправилната регулация на ДНК метилирането на CD4+ T клетките е асоциирано с развитието на SCLE.

Хипометилиране на геномната ДНК се наблюдава при наличие на атеростерасклеротични плаки. Промени в метилационния профил има и при промоторите на някои гени, имащи отношение към патогенезата на атеросклерозата: супероксид дисмутаза, естроген рецептор α, ендотелна азотен оксид синтаза и 15-липоксигеназа [434].

7.2.6. Модификации в ДНК метилационния профил при заболявания, свързани с нарушения в импринтинга

Продуктите на импринтинг локусите са важни регулатори на растежа и развитието. Заболяванията, свързани с нарушения в импринтинга са свързани както с генетични така и с епигенетични мутации, включително промени в метилирането на ДНК в рамките на контролните импринтинг региони (ICRS).

Синдрома на Beckwith-Wiedemann (BWS) и синдрома на Russell-Silver (RS) са свързани с нарушения на растежа с противоположни епимутации, засягащи H19/IGF2 импринтинг центъра в 11p15.5. Свръхрастеж и риск за развитие на тумор на при BWS е причинено от аберантна експресия от бащиния *IGF2* ген в резултат на мозаично хиперметилиране в център на импринтинг или на мозаечна бащина унипарентна дизомия. При част от случаите на RS наскоро е доказано мозаечно хипометилиране в H19/IGF2 импринтинговия център, като това предполага заглушаване на бащиния експресиран *IGF2* в ранното развитие [435].

Хипометилиране на множество импринтинг локуси при индивидите с преходен неонатален диабет е свързано с мутация в *ZFP57*, който кодира транскрипционен фактор, експресиран през ранното развитие [436].

Вътрегенните диференциално метилирани региони на *DLK1- MEG3* и *MEG3* в 14q32.2, които са значително хиперметилирани при унаследяване от бащата и силно хипометилирани при унаследяване от майката, са значително хипометилирани при пациенти с майчина унипарентна дизомия за хромозома 14 (upd(14)mat) – подобен фенотип, при отсъствие на upd(14)mat и делетиране на DMR. Това откритие показва, съществуването на епимутация – хипометилиране, засягащо обикновено метилирани DMR с бащински произход [437].

7.2.7. Модификации в ДНК метилационния профил при психиатрични заболявания

Анализите за скаченост и асоциативните проучвания предполагат принос на генетиката за развитието на шизофрения [1], но до момента няма конкретен ген, който да се свързва с етиологията на заболяването. В последните години са започнали проучвания относно участието на епигенетични процеси в патофизиологията на шизофренията.

Данните относно ролята на епигенетичните процеси при шизофрения до момента са натрупани от анализа на малък брой проби, получени от различни клетъчни и тъканни типове. Изследвани са основно специфични геномни региони, най-често с предварително известни кандидати. Използвани са голям брой различни методологични подходи като малка част от асоциираните със заболяването разлики са валидирани с различни методи или са повторени в допълнителни извадки. С напредването на технологиите става възможно цялостното-геномно изследване на епигенома върху голям брой проби. При изследването на метилационния статус на 12 000 регулаторни региони от фронтален кортекс са установени разлики в множество локуси, включително участващи в глутаматергичната и ГАМКергичната невротрансмисия, развитието на мозъка и други процеси, свързани с етиологията на заболяването [438]. Проведено е цялостно геномно изследване за ДНК метилационните разлики между едноядрени близнаци дискордантни по отношение на шизофренията. Наблюдавани са значителни вариации, асоциирани със заболяването. Голяма част от епигенетичните

нарушения са съсредоточени в биологични пътища, имащи отношение към психиатричните заболявания и развитието на нервната система [439].

Една от първоначалните хипотези е свързана с епигенетичния контрол на генната експресия, по-специално ДНК метилиране, в промотори на рецепторите за γ-аминомаслената киселина в невроните [440]. Проучванията направени на постмортем тъкан съобщават за потискане на няколко гена, експресирани в ГАМК-ергичните неврони, включително *reelin* и *GAD1*, при индивиди с шизофрения. Това предполага, че нарушаването на инхибиторните пътища в невроните допринася за дефицитите, наблюдавани при тези пациенти [441, 442]. Интересното е, че промоторът на *reelin* гена съдържа CpG остров, за който се предполага, че може да бъде податлив към епигенетични модификации чрез метилиране на ДНК [443]. Последните изследвания съобщават за повишено метилиране в промоторната област на *reelin* в постмортем мозъчна тъкан на пациенти, диагностицирани с шизофрения [444, 445]. Освен това, *in vitro* експерименти с използване на клетъчни линии показват, че третирането с DNMT1 инхибитор аза-2'-дезоксицитидин значително повишава експресията на мРНК за *reelin* [443]. В миши модел на шизофрения, третирани с L-метионин (съединение, което изостря симптомите на шизофрения при хора), има понижени нива на експресия на *reelin*. Това е свързано с хиперметилиране на промотора на гена след хронично приложение на L-метионин [446]. Тези данни предполагат възможната роля на промените в метилирането на ДНК при регулирането на нивата на експресия на *reelin* и потенциално етиологията на шизофренията. Все още не е установено, кои DNMT-и (DNMT1, 3a или 3b) участват в осъществяването на тези промени и какво е значението на тези специфични гени за патофизиологията на заболяването.

При друго изследване на индивидуалния метилационен профил в промоторни области на някои гени не се установява хиперметилиране в промоторната област на *reelin* в проби от мозък на пациенти с шизофрения [447]. При предишни изследвания са намерени понижени нива на РНК и белтък, както и промоторно хиперметилиране на *reelin* и е предположено участието им в патофизиологията на болестта. *Reelin* гена е от голямо значение в психиатричните разстройства, тъй като отклонения от нормалното метилационно състояние на ДНК в участъка за BssHII метилационно-чувствителен рестрикционен ензим в гена *reelin* в предните отдели на главния мозък могат да доведат до податливост към психиатрични разстройства [448].

По същия начин, промоторът на *GAD67* е богат на GC динуклеотиди. Предполага се, че промените в метилирането може да регулират активността на *GAD67* по подобен начин на *reelin*, което може да бъде в основата на функционалните дефицити на тези гени, както се вижда при пациенти с шизофрения. Последни разработки показват корелация in vitro между повишена експресия на *GAD67* и хипометилирането на основни региони в промотора след прилагане на MS-275 (инхибитор на хистоновото метилиране), предоставящи някои доказателства, че *GAD67* е склонен към хиперметилиране [449]. Тези изследвания са проведени с помощта на фармакологични агенти, които са с ниска специфичност и са необходими допълнителни изследвания, за да се разберат механизмите, които водят до промени в метилирането и регулират функцията на *GAD67*.

Няколко скорошни изследвания са докладвали промени в DNMT1 и DNMT3a в постмортем тъкани от пациенти с шизофрения. Това допълнително предполага потенциалното участие на анормално ДНК метилиране в процеса на заболяването. В група от пациенти, някои от които са подложени на антипсихотично лечение, е налице значително увеличение в експресията на DNMT1 в кортикални ГАМК-ергични неврони при пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли [443, 450]. По същия начин, експресията на DNMT3a (но не DNMT3b) е значително повишена при ГАМК експресиращи неврони в кората на главния мозък на пациенти с шизофрения и увеличението не зависи от приемането на антипсихотични лекарства [451]. Това значително нарастване в експресията на DNMT-ите в постмортем мозъчна тъкан от пациенти с шизофрения показва, че те могат да бъдат отговорни за хиперметилиране на гени в ГАМКергични неврони включително *reelin* и *GAD67*. Тези данни са в подкрепа на преобладаващото мнение, че промените в ДНК метилирането на ключови гени в рамките на ГАМКергични неврони може да имат значителна роля в етиологията на шизофренията.

Проучванията на цялостните ДНК метилационни модели не показват разлики в общото геномно ДНК метилиране на периферни кръвни левкоцити между пациенти с шизофрения и контроли. Не е установена връзка между глобалното ДНК метилиране на левкоцити и нивата на хомоцистеин, но нивата на хомоцистеин са по-високи при пациенти с шизофрения, отколкото при контроли [452]. Има тенденция за по-ниско съдържание на метилиран де(з)оксицитидин (mC) в ДНК на левкоцити при пациенти от

мъжки пол с шизофрения в сравнение с контроли, като тази разлика е по-видна при по-млади индивиди. При жените не е наблюдаван ефект от възрастта или етапа на заболяването върху съдържанието на mC. Тези данни показват, че има значителна разлика в зависимост от пола на съдържанието на mC в ДНК от човешки периферни левкоцити при пациенти с шизофрения [453].

Открито е повишено метилиране на промотора на ГАМК (GABAA) рецептор субединица α1 в кората на преднополярните отдели на мозъка при индивиди, които са извършили самоубийство и тази метилационна промяна корелира с изменението на експресията на DNMT. [454].

Установена е повишена експресия на DNMT1 и DNMT3a в различни ГАМКергични невронни популации, както и в левкоцити от периферна кръв на пациенти с шизофрения. По тази причина се предполага, че периферните левкоцити могат да се използват за откриване на диагностични епигенетични маркери, обясняващи заболеваемостта от шизофрения [451].

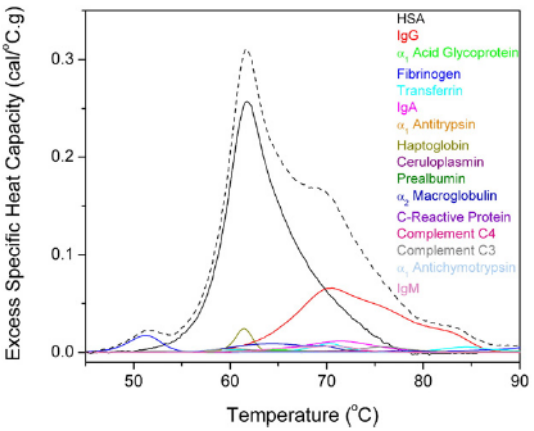
8. Диференциална сканираща калориметрия в диагностиката

Диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) се използва при изследване на топлинната стабилност на белтъци в по-сложни биологични системи, биологични мембрани, плазмения протеом и други, както и при създаването на лекарствени препарати. За първи път Garbett et al. предлагат възможността за прилагането на ДСК за ранна диагностика и мониторинг на заболявания [455]. Авторите са изследвали топлинното поведение на кръвна плазма от здрави и болни индивиди и показват типична термограма за здрави хора, и драстична модификация на плазмата на пациенти с равматоиден артрит, лаймска болест, рак на шийката на матката и други [455-457]. Michniet al. твърдят, че има ясно изразени промени в термограмите на кръвен серум от пациенти с хронично белодробно заболяване в сравнение със здрави индивиди [458].

На тази база, авторите смятат, че характерните за дадено заболяване термограми могат да бъдат използвани като биомаркери. Няколко повече или по-малко мащабни проучвания потвърдиха тази хипотеза [459-461]. Така например проби от 30 пациенти диагностицирани с карцином на белите дробове показаха уникална термограма, различна от тази на контролите [462].

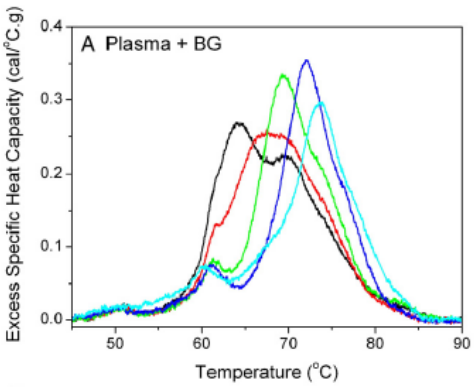
8.1.Принос на плазмените белтъци към ДСК термограмата

Плазменият протеом на човека е изключително комплексна система. Счита се, че съдържа над 3000 белтъка и пептида в концентрации от пикограми до десетки милиграми на милилитър, 22 от които обаче съставляват 99% от общата маса на плазмата. Албуминът представлява 60% от плазмените белтъци, глобулините – 35%, а фибриногена – 4%. Смята се, че останалият 1% съдържа потенциални биомаркери, белтъци и пептиди, и съответно много ценна информация за присъствието на определени заболявания, които биха могли да се определят при клинични диагностични тестове (Фиг. 9).



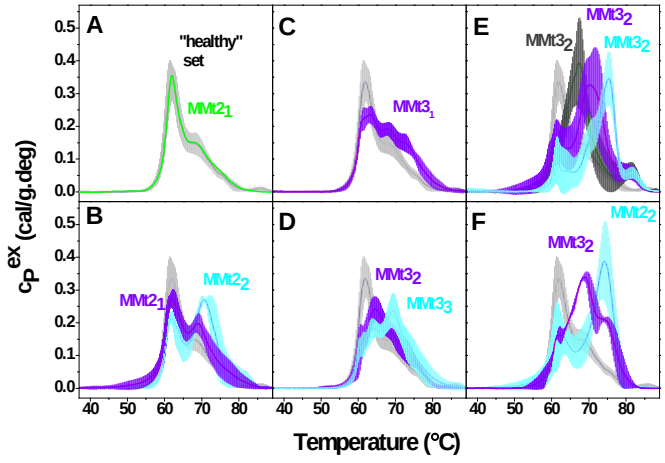
Фигура 9. Термограма на плазма (точкова линия) получена от сумата на термограмите на 16 от плазмените белтъци, намиращи се в най-голямо количество в плазмата нормирани по тяхната концентрация. Адаптирана от Garbett et al. [456].

Като алтернатива наскоро беше предложено прилагането на ДСК, метод който е изключително чувствителен към промени в количеството на плазмените белтъци и техните взаимодействия. Въпреки че методът не детектира директно биомаркерите, той демонстрира последиците от техните взаимодействия с плазмения протеом. Например свързването на бромокрезол към албумин в кръвната плазма води до значителни промени в ДСК термограмата, показани на Фиг. 10. В този смисъл ДСК термограмите могат да дадат ценна информация, комплементарна на наличните техники за детекция на биомаркери, и може да се развие като нова диагностична техника.



Фигура 10. Ефект на свързването на различни концентрации бромкрезол (30 μM (червена линия), 148 μM (зелена линия), 290 μM (синя линия) или 686 μM (светло синя линия)) върху плазмената термограма на здрави индивиди [456].

Първото изследване на пациенти диагностицирани с множествен миелом (ММ) разкрива няколко групи и подгрупи характерни термограми (Фиг. 11, [463]), различни от тези публикувани за изследваните от други автори заболявания споменати по-горе (карцином на белите дробове, лаймска болест, ревматоиден артрит (РА), системен лупус, рак на шийката на матката и други) [455-457].



Фигура 11. Характерни ДСК профили на кръвен серум от пациенти с множествен миелом, усреднени термограми (плътни линии) и стандартни отклонения (щриховани области) на кръвен серум от здрави индивиди (тъмно синьо и щрихована област в светло сиво) и ММ пациенти (зелено, синьо, лилаво и тъмно сиво) (A-F).

Установени са характерни отмествания в температурата на основния преход, съответстващи на количеството и типа на секретираните моноклонални имуноглобулини, IgG, IgM, IgA. Термограмите на ММ са класифицирани на няколко групи/подгрупи на базата на термодинамичните параметри. Според броя на преходите са определени 2 групи термограми, означени ММt2 и ММt3 съответно с 2 и 3 прехода.

Метилационните промени имат отношение към промяна на генната експресия. При шизофрения промените в метилационните профили все още са слабо проучени. Провеждането на лечение променя метилационния статус при различни заболявания. Определянето на най-подходящото антипсихотично лечение и точната доза все още изискват въвеждането на нови техники. В литературата липсват данни за ефекта от лечението върху метилационния профил и протеомните промени при шизофрения. Това налага задълбоченото изучаване на цялостните-геномни метилационни промени и термодинамични характеристики с цел по-добро разбиране на етиопатогенезата на шизофрения, подпомагане на диагностицирането и лечението.

III. Цел и задачи

Цел

Целта на настоящото изследване е да се характеризират диференциално метилирани райони в генома, калориметричните профили и тяхната динамика в кръвни проби от пациенти с шизофрения.

Задачи

1. Да се изготвят ДНК-пулове от проби на пациенти с шизофрения и здрави контроли.
2. Да се определи метилационния статус чрез цялостен геномен метилационен микрочипов анализ на ДНК пулове и индивидуални ДНК проби от пациенти с шизофрения и здрави контроли.
3. Да се определят различно метилирани райони (DMR) в пулове от проби на: пациенти/контроли и полово специфични разлики между пациенти/контроли
4. Да се потвърдят резултатите от пул анализа в индивидуални проби от пациенти с шизофрения.
5. Да се проследи динамиката в метилационните профили при пациенти с шизофрения преди и след лечение.
6. Да се определят разликите и динамиката в термограмите на протеомните калориметрични профили между пациенти/контроли преди и след лечение.
7. Да бъде разширена ДНК банката и да бъде създадена нова банка от серуми от пациенти с шизофрения и здрави контроли в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински университет, София.

IV. Материали и методи

Основната група пациенти обхваща 312 пациенти и 220 контроли. За целите на метилационния ДНК микрочипов анализ са анализирани като сборни проби 220 от пациентите и 220 от контролите. При 20 от останалите проби е проведен индивидуален метилационен микрочипов анализ. За протеомно изследване са използвани 92 проби от пациенти с шизофрения. За проследяване на ефекта от лечението е проведен микрочипов анализ на втора проба при 20-те индивидуални проби и протеомен анализ при 23 от пациентите.

Средната възраст на изследваните лица е 42 год. (SD = 11) при пациентите от мъжки пол и 45 год. (SD = 11) при пациентите от женски пол. От тях 149 са от женски пол, а останалите 140 от мъжки пол. В контролната група средната възраст при мъжете е 50 год. (SD = 14), а при жените е 51 (SD = 14). Таблица 2 показва основни демографски показатели на изследваните пациенти и контроли. ДНК метилационен микрочипов анализ е проведен на 240 пациента, а на 92 е проведен протеомен анализ. С двете техники са изследвани 20 от пациентите. Основната част от пациентите за настоящето проучване е набрана в рамките на съвместни проекти „Протеомен скрининг в серум от пациенти с шизофрения при различни етапи и видове терапия" и "Определяне на специфични епигенетични промени при пациенти със шизофрения чрез метилационен ДНК - микрочипов анализ" на Катедрата по Медицинска генетика, Медицински университет – София и Катедрата по Психиатрия, Медицински университет – София с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания" към МОМН, Грант ДО 02-12/10.02.2009 и ДМУ 03 36/12.12.2011. Част от протеомните изследвания са проведени по проект „Алтернативен метод за мониторинг на промени в серумния протеом при шизофрения", финансиран от СМН към Медицински университет – София, Договор № 22-Д/2011 г.

Таблица 2. Демографски характеристики на изследваните индивиди.

Показател	**Пациенти**	**Контроли**
Брой индивиди	**Общо 532**	
	312	220

Средна възраст (в години)	43,5		50,5	
SD (в години)	±11		±14	
Пол (в брой)	**мъже**	**жени**	**мъже**	**жени**
	150	162	110	110

Всички участници в изследването (пациенти и контроли) са запознати със същността на изследването чрез писмена форма „Информация за участниците" и са подписали информирано съгласие за участие. Провеждането на изследванията е одобрено от етична комисия.

Голяма част от ДНК пробите (200/185 пациенти и 200 контроли) за настоящото проучване са набрани в рамките на съвместен проект на Катедрата по медицинска генетика, Медицински университет София и Катедра по невропсихиатрична генетика, Медицински университет, Кардиф, Великобритания, с финансовата подкрепа на Janssen Research Foundation (в периода 2000 – 2006 г.). Останалите ДНК проби от пациенти и контроли са набрани допълнително от Катедрата по медицинска генетика, Медицински университет София през периода 2007 – 2011 г.

Всичките индивиди, включени в настоящото изследване са от български произход. Участниците в изследването са пациенти на пет психиатрични болници в цяла България (в град София, Раднево, Пловдив), както и пациенти на четири психиатрични диспансера (в град София, Пловдив и Благоевград, Русе). Те са събрани от лекуващите ги лекари психиатри на базата на цялата достъпна информация за пациента, включително епикризи, картони на пациента и лично полу-структурирано интервю със съкратената версия на СКАН (SCAN; Schedule of Clinical Assesment in Neuropsychiatry) (Wing et al, 1990). Поставена е консенсусна диагноза - шизофрения съгласно международната система за диагностика DSM-IV (American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, 4thed.).В настоящата работа са използвани и 220 здрави, несвързани родствено помежду си контролни индивиди.

Настоящият научно-изследователски труд е част от дългогодишна работа на Катедрата по медицинска генетика към МФ, МУ-София, върху изследванията за идентифициране на генетичните фактори при някои от най-честите психиатрични заболявания. В резултат от усилията на редица изследователи е създадена значителна по обем банка от ДНК-проби и база данни с придружаващата ги подробна информация от триоси с пробанди с шизофрения или афективни разстройства, от случаи с шизофрения или афективни разстройства, и от незасегнати от психиатрично заболяване контролни индивиди. Част от пробите – случаи и контроли, от тази банка са използвани за провеждане на настоящата работа. С помощта на партньорите от психиатричните клиники са събрани кръвни проби и клинична информация от 92 пациента: кръвни проби от пациенти с шизофрения преди начало на терапия или три месеца след започната вече такава; втори кръвни проби от същите пациенти три месеца след започване на терапия или след смяна/прекратяване на терапията съответно; клинични карти с данни на пациентите с шизофрения и информирани съгласия от участниците. Кръвните проби и придружаващата ги документация са транспортирани и съхранявани в централизирана банка за биологични материали към Катедрата по Медицинска генетика, Медицински университет – София. Поради трудностите при откриването на пациенти, неподлагани на медикаментозно лечение, както и проследяването на пациентите няколко месеца след начало на терапията, при част от пациентите не са събрани втори проби. Като биологичен материал кръвта е най-лесно достъпна и най-често използвана в био-медицинските проучвания. Материалът може да се взима многократно, в различни стадии на дадено заболяване и по време на различни курсове на терапия, с минимален дискомфорт и риск за странични ефекти при пациента.

Диагнозата е поставена от опитен специалист психиатър на базата на проведено интервю в участващите в проекта психиатрични болници съгласно критериите на МКБ – 10 и Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR). Състоянието на пациентите е проследено чрез използването на "Диагностично интервю за психози". Оценено е и психологичното, социалното и професионалното функциониране на всеки един от пациентите, като е използвана Global Assessment of Functioning (GAF) Scale.

Изготвена е база данни- таблица, в която са въведени демографски и клинични данни за пациентите, както и за провежданото лечение. Пациентите са разделени на

подгрупи в зависимост от времето на вземане на биологичния материал (преди или след започване на терапия), пола и ефекта от терапията.

Метилационният микрочипов анализ е проведен с високомолекулна геномна ДНК, изолирана от биологичен материал кръв. От всеки участник е взета венозна кръв (10 мл) от кубиталната вена, чрез затворена вакутейнер система, при спазване на стандартните процедури за стерилност. Кръвта е взета до един час след нахранване (във връзка с постпрандиалното увеличение на левкоцити, от които е изолирана ДНК) и съхранявана при +4ºC до транспортирането в лабораторията на Катедрата по медицинска генетика. ДНК е изолирана не по-късно от 24 часа след вземане на пробата. След изолирането на високомолекулна геномна ДНК, тя е съхранявана в разтворено състояние в ТЕ буфер при -20ºC в ДНК-банката на Катедрата по медицинска генетика.

1. **Изолиране на високомолекулна ДНК**

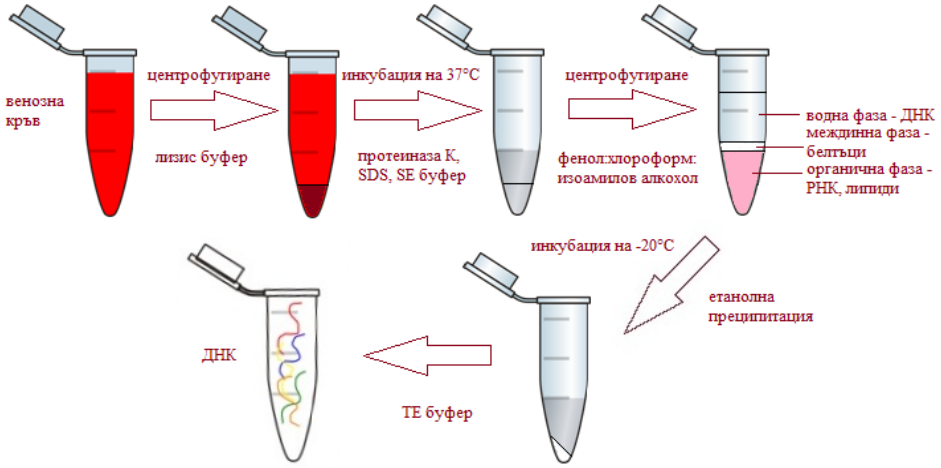
Принцип:

Най-подходящ метод за изолиране на ДНК, предназначена за микрочипов анализ, е изолиране на ДНК чрез фенол-хлороформна екстракция. При този метод се получава максимален добив от високомолекулна ДНК с много висока чистота. Изолирането на ДНК чрез фенол-хлороформна екстракция се основава на извличането на белтъци и други съставки от клетъчен лизат в органична фаза, като ДНК остава във водната фаза и се преципитира с етанол (Фиг.12).

Методът включва няколко етапа:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Утаяване на ядрата след центофугиране;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (детергент, който дисоциира белтъците от ДНК и създава условия за действието на ензима);
- Очистване на белтъците и протеиназата от ДНК чрез последователно третиране с фенол, фенол : хлороформ : изоамилов алкохол (25:24:1) и хлороформ : изоамилов алкохол (24:1);

- Утаяване на ДНК с 96% етанол;
- Промиване с 70% етанол;
- Разтваряне на ДНК в 500-1500µl стерилен ТЕ буфер и съхраняване на – 20ºС.



Фигура 12. Изолиране на геномна ДНК чрез фенол:хлороформна екстракция

Протокол за изолиране на високомолекулна ДНК

- В епруветки с антикоагулант K_3EDTA се събират 10ml венозна кръв.
- В 50 мл пластмасова стерилна центрофужна епруветка към кръвта се добавят 30ml студен, прясно приготвен лизис буфер (pH 7.4) (155 mM NH4Cl; 10 mM KHCO3; 0,1 mM EDTA pH 7.4 (NaOH)) и сместа се оставя за 30 минути на ледена баня.
- Двукратно се центрофугира на 3500xg на стайна температура за 15 минути (центрофуга Rotina 46) и се отстранява надстоящата течност.
- Утайката (бели кръвни клетки) се разтваря в 3ml SE буфер (75 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8.00 (NaOH)) чрез разбъркване. Добавят се 300µl 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate Gibco^{BRL}) и 50µl от 20mg/ml разтвор на протеиназа К (Promega).
- Сместа се инкубира на 37°С за една нощ (в инкубатор).

- Добавя се равно количество (около 3ml) фенол (Merck), еквилибриран с Tris pH 8.0; Вортексира се на ниски обороти; Центрофугира се на 3500xg на стайна температура за 15 минути.

- Горната водна фаза се прехвърля в чиста центрофужна епруветка. Добавя се равно количество смес от фенол : хлороформ (Merck) : изоамилов алкохол (Merck) в съотношение 25:24:1. Разбърква се на вортекс и се центрофугира на 3500xg на стайна температура за 15 минути.

- Горната водна фаза се прехвърля в чиста центрофужна епруветка. Прибавя се равно количество смес от хлороформ:изоамилов алкохол в съотношение 24:1. Разбърква се на вортекс и се центрофугира на 3500xg на стайна температура за 15 мин.

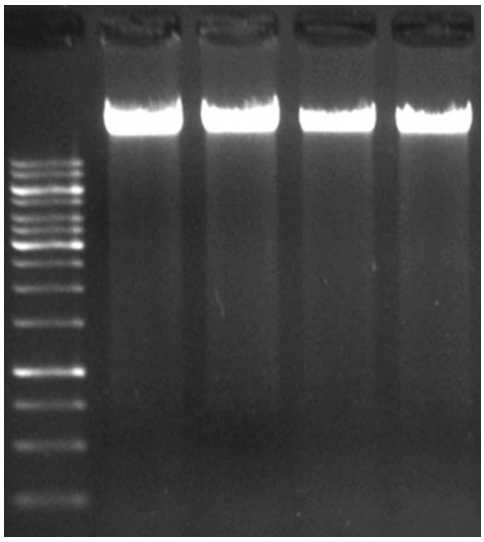
- Водната фаза се прехвърля в чиста епруветка и се добавят 3 обема ледено студен абсолютен етанол (96%) (Merck). Епруветката се обръща няколко пъти до преципитиране на ДНК, след което се съхранява на –20ºC за минимум 2 часа.

- ДНК преципитатът се промива в 70% етанол и се изсушава на стайна температура, след което ДНК се разтваря в 500-1000µl стерилен TE буфер (10 mM Tris; 0,1 mM EDTA pH 7.4). Епруветките се поставят на въртяща се платформа докато ДНК напълно се разтвори (12-24 часа на стайна температура, или на 4ºC за по-дълго време). Съхранява се на –20ºC.

Качествена и количествена оценка на ДНК

Концентрацията на ДНК пробите е измерена с помощта на спектрофотометър NanoDrop 2000c (ThermoScientific). Методът се основава на наличието на специфичен абсорбционен пик за ултравиолетова светлина с дължина на вълната λ=260nm от пуриновите и пиримидиновите бази в ДНК, като на базата на количеството абсорбирана светлина, се изчислява концентрацията на молекулата, през която тя е преминала. Измерването изисква едва 1,5-2µl проба, което позволява минимални „загуби" на геномна ДНК. Освен концентрацията на ДНК се определя и съотношението 260nm:280nm (стойности между 1,8 и 2,0), което показва контаминация с белтъци или с РНК и съотношението 260nm:230nm (стойности между 1,8 и 2,0) и е показател за замърсяване с неорганични вещества.

Качествена оценка за наличието и степента на деградацията на ДНК е направена с помощта на хоризонтална нисковолтова агарозна гел електрофореза в 1% агарозен гел с етидиев бромид. За микрочиповия анализ са използвани само ДНК проби, които отговарят на критериите за чистота и интегритет (>1-2kb). Проби, при които се наблюдава разлята пътечка (smear) при отчитането на трансилюминатор е показател за ДНК-деградация (Фиг. 13).



Фигура 13. Оценка на интегритета на геномна ДНК върху 1% агарозен гел.

След изолирането ДНК пробите са съхранени в ДНК банката към Катедрата по Медицинска генетика, МУ-София като по този начин е разширена вече съществуващата ДНК банка. За молекулярно-генетичния анализ са използвани индивидуални ДНК проби и ДНК пулове.

2. Изготвяне на сборни ДНК проби (пулове)

ДНК пуловете са приготвени като еднакво количество ДНК от всеки един пациент се слага в една обща епруветка (един пул). По същия начин ДНК от всяка една контролна ДНК се слага в друга епруветка (втори пул) [260].

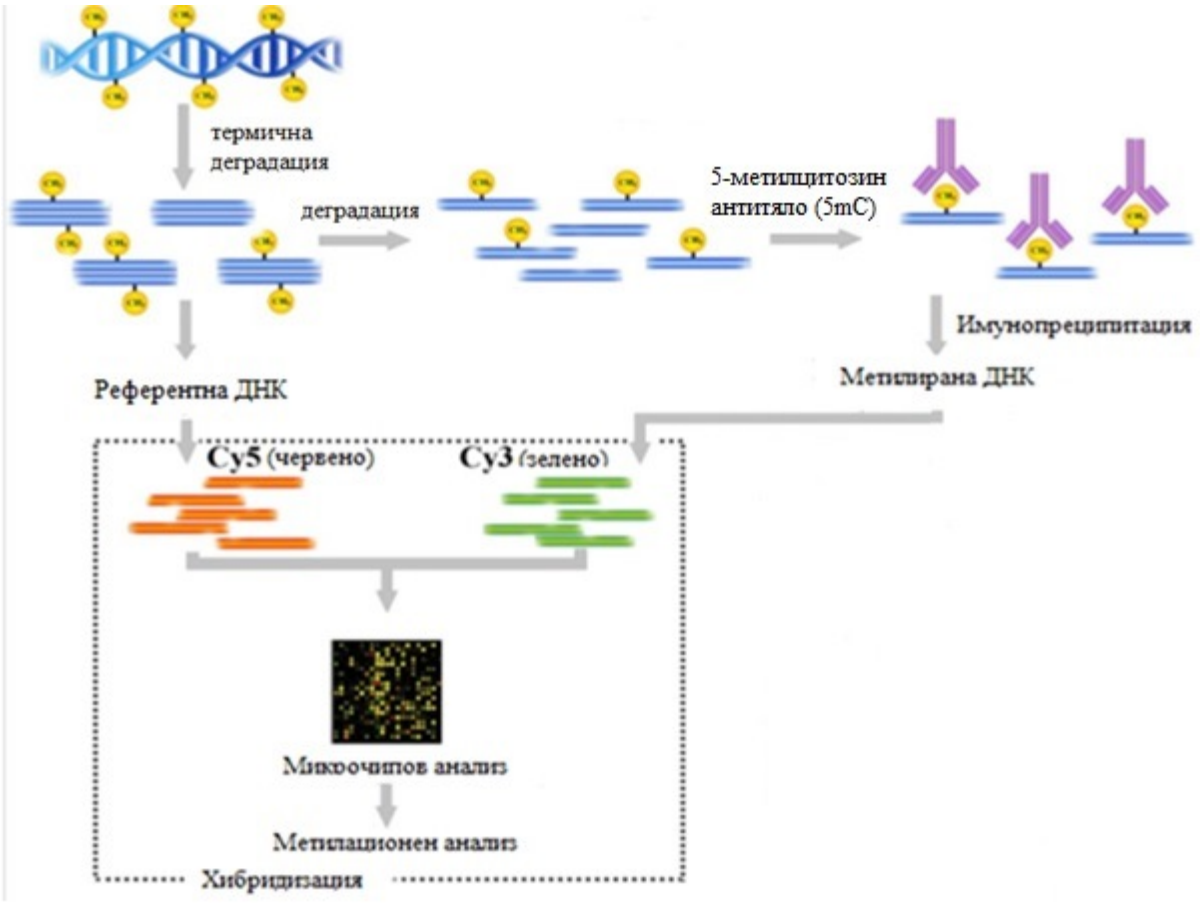
При приготвянето на ДНК пуловете от значение е точното определяне на концентрацията на ДНК във всички проби, които участват в пула. Първоначално ДНК пробите се разреждат до концентрация 100 ng/µl. Следва смесване на равни количества ДНК от вече разредените ДНК проби [260].

При метилационния анализ са използвани шест ДНК пула, конструирани от общо 220 пациенти и 220 контроли:

1. Общ пул от 220 пациенти с шизофрения;
2. Общ пул от 220 здрави контроли;
3. Пул от 110 пациенти жени;
4. Пул от 110 пациенти мъже;
5. Пул от 110 здрави контроли жени;
6. Пул от 110 здрави контроли мъже.

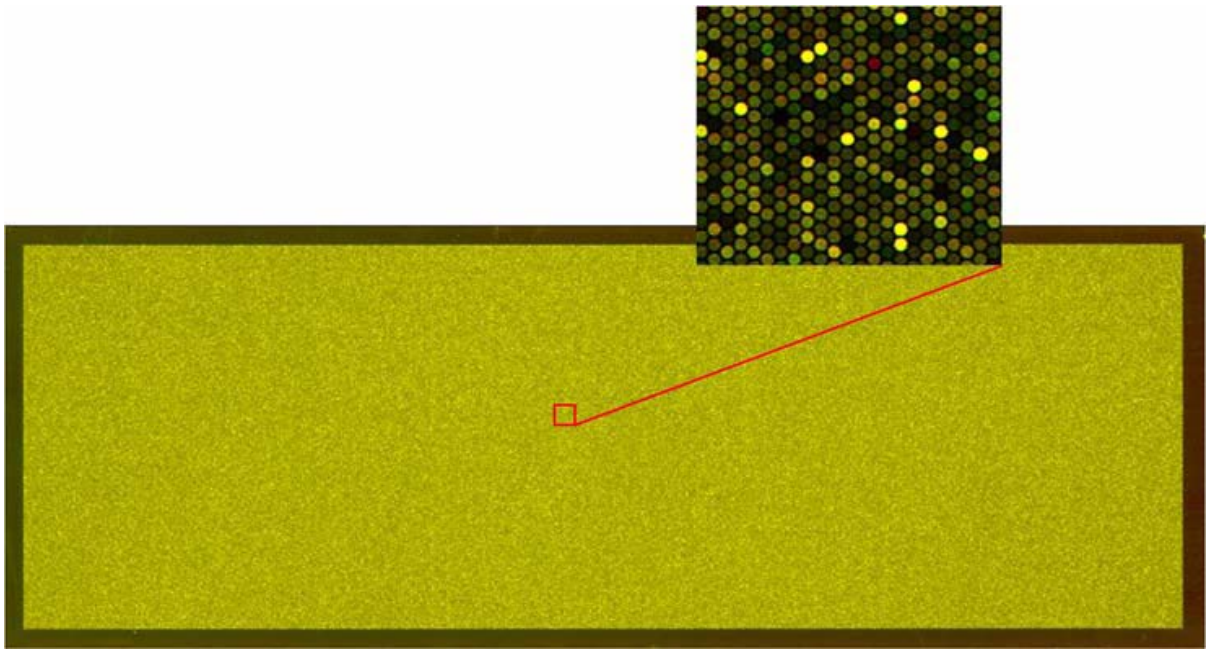
3. Микрочипов анализ на имунопреципитирана метилирана ДНК

За анализа е използван метода на сравнителната геномна хибридизация чрез метилационни олиго микрочипове. Конвенционалните методи за анализ на ДНК метилирането като бисулфитно превръщане и специфичен PCR са недостатъчно продуктивни, възпроизводими и доста скъпи. По тези причини е използван един изключително нов не само за България, но и за света подход - метилационни олиго микрочипове. Техниката на метилационните олиго микрочипове е разработена сравнително скоро. Те са високоефективни, с добра възпроизводимост и позволяват едновременен анализ на изключително голям брой CpG – острови. За първи път в България в колектива на Катедрата по Медицинска генетика е разработена стратегия и е оптимизиран протокол за изработване и анализ на метилационни микрочипове. Принципът на сравнителната геномна хибридизация чрез метилационни олиго микрочипове се базира на конкурентната хибридизация на алтернативно белязани тествана (метилирана) и контролна (неметилирана от същия пациент) ДНК върху картирани и секвенирани 60 – мерни геномни клонове, фиксирани върху твърд носител под формата на микрочипове (Фиг. 14).



Фигура 14. Схема, представяща техниката на метилационни олиго микрочипове. Принципът на метода се състои в конкурентна хибридизация между белязани с различни флуоресцентни багрила (Cy3 - Cyanine 3, цианин 3 и Cy5 - Cyanine 5, -цианин 5) тест- и контролна ДНК с фиксирани върху предметни стъкла ДНК секвенции (олигонуклеотиди).

Използвани са олигонуклеотидни микрочипове с платформата на Agilent, формат 1x244K, с гъстота 237,227 секвенции, обхващащи 27,627 CpG – острови (Фиг.15).



Фигура 15. Сканиран метилационен микрочипов образ

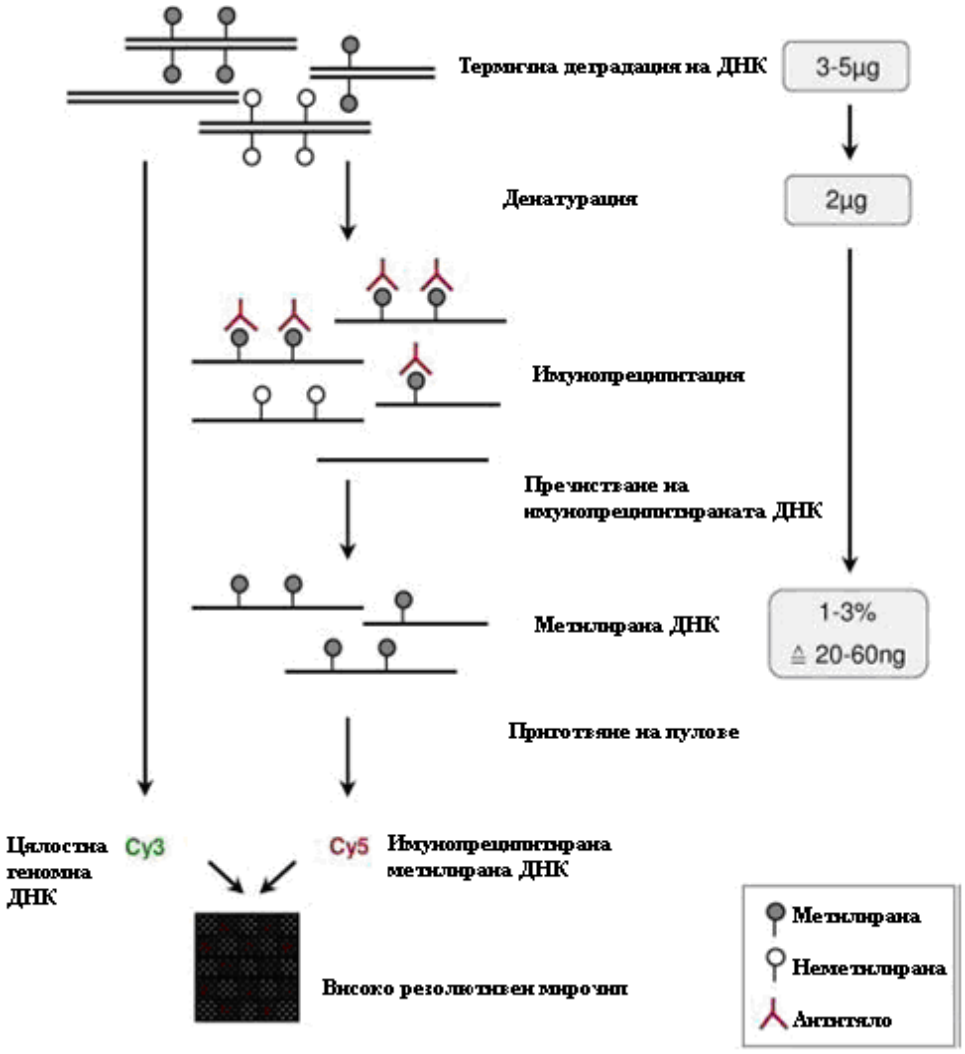
Микрочиповете на Agilent осигуряват оптимална чувствителност и специфичност. Патентованата микрочипова технология, която използва 60-мерни олигонуклеотидни сонди и удобна система за двуцветно белязане осигурява по-висока чувствителност, точност и по-голяма възпроизводимост от други конкурентни платформи. Тези уникални характеристики позволяват чувствителни измервания, както и преки сравнения на проби на един и същ микрочип.

Микрочиповете на Agilent за изследване на метилационния профил на CpG острови използват уникални проби, синтезирани по технологията SurePrint. Представляват 60-мерни олигонуклеотидни проби синтезирани директно върху чипа, което води до висока степен на чистота и висока прецизност на сондите. Те са разпръснати из целия геном с известни хибридизационни свойства съгласно стандартните критерии за проектиране на сонди на Agilent (с изключение на теоретичното ограничение на Tm). За някои сонди, благодарение на високото съдържание на CG в CpG островите, стандартното ограничение на Tm се повишава, за да се постигне подходящо разстояние. 60-мерни олигонуклеотидни сонди осигуряват стабилна хибридизация - критична за чувствителността и специфичността, необходима за изискванията на ДНК метилационните изследвания. Средните параметри за разстояние на сондите са оптимизирани специално за целите на ДНК метилирането, в сравнение с други методи за микрочипов анализ. Повторените региони са замаскирани

за значително намаляване на неспецифичния шум. Критериите за дизайн на сондите включват оптимална Tm, уникална последователност, както и информация за конформацията [336, 337, 464].

Микрочиповете на Agilent за изследване на CpG острови са предназначени за високо резолютивен анализ на ДНК метилиране, използвайки различни методи за подготовка. Дизайна е съвместим както с афинитетно-базираните [465-467], така и рестрикционно-базираните [468] методи за набогатяване на метилираната ДНК. Рестрикционно-базирните методи са ограничени от разположението на рестрикционните места по отношение на локализацията на сондата.

Дизайн на експеримента



Фигура 16. Имунопреципитация на метилираната ДНК.

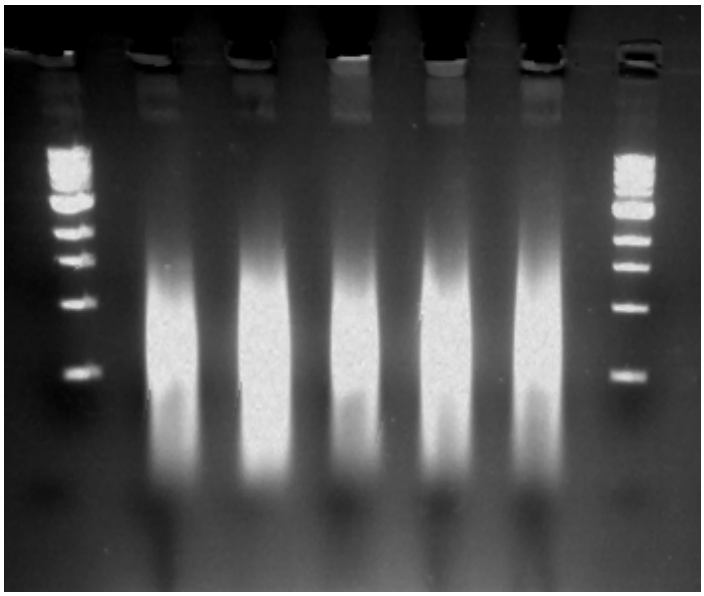
Имунопреципитацията на метилираната ДНК е молекулярно биологична цялостно-геномна техника на пречистване, използвана за набогатяване на метилирани ДНК последователности. Състои се от изолиране на метилирани ДНК фрагменти чрез антитяло, срещу 5-метилцитозин (5mC) (Фиг.16). Тази техника за първи път е описана от Weber et al. през 2005 г. [465].

Има два основни подхода за метилационен анализ. В първата група са включени техники като PCR, мас спектрометрия и рестикционни анализи. Те се използват за изследване на малък брой локуси при множество проби. Другата група технологии са насочени към цялостно-геномно или метиломно изследване с помощта на техники като бисулфитна конверсия, рестикционно геномно сканиране (RLGS) и имунопреципитация на метилираната ДНК [469-473].

Рестрикционните техники имат ограничението на броя на рестрикционните места в генома [474]. Бисулфитната конверсия има недостатъка, че превръщането на неметилирания цитозин в урацил може да е нестабилно [475]. Методите на бисулфитна конверсия не са подходящи за използване с ДНК микрочипове [476].

Имунопреципитация на метилирана ДНК (MeDIP)

Геномна ДНК се изолира от кръвни клетки и се пречиства. Пречистената ДНК се подлага на термична деградация с цел срязване на ДНК на произволни фрагменти. Този процес е бърз, прост и избягва недостатъците при използване на рестриктази. Получените фрагменти варират между 300-1000 базови двойки (bp) в дължина, въпреки че те обикновено са между 400 и 600 bp [477] (Фиг.17).



Фигура 17. Оценка на дължината на ДНК фрагментите след термична деградация върху 1% агарозен гел.

Малката дължина на тези фрагменти е важна за получаване на адекватна резолюция, подобряване на ефикасността на последващите стъпки и намаляване на ефектите от дължината на фрагментите и др. Също така, размерът на фрагмента се отразява на свързването на 5-метил-цитозин (5mC) антитялото, тъй като антитялото се нуждае от повече от един 5mC за ефективно свързване [22]. За да се подобри афинитета на свързване на антителата, ДНК фрагментите са денатурирани за получаване на едноверижна ДНК. След денатурация на ДНК се инкубира с моноклонални 5mC антитела. Прилага се класическа техника за имунопреципитация: магнитни частици, конюгирани с анти-миши-IgG се използват за свързване на анти-5mC антитела докато несвързаната ДНК се отстранява със супернатанта [465, 475, 478, 479].

Процеса включва (Табл.3):

- Подготовка на пробите: Изолиране на метилирана ДНК от пречистени геномни ДНК проби.
- Белязане на метилираните и цялостните геномни ДНК проби.
- Пречистване и комбиниране на белязаните проби.
- Хибридизация.

- Промиване.
- Сканиране на промитите микрочипове.
- Софтуерна обработка на получените резултати и анализ.

Етапи	Време за изпълнение
1. Подготовка на пробите	~3 дни
1.1 Свързване на антитялото към магнитните частици	0.5 ч., инкубация за една нощ
1.2 Деградиране на ДНК	1 ч.
1.3 Имунопреципитация на метилираната ДНК	0.5 ч.,инкубация за една нощ
1.4 Промивка, елуиране	2 ч.
1.5 Пречистване на ДНК с фенол:хлороформ:изоамилов алкохол	2 ч.
2. Белязане на имунопреципитираната и референтната ДНК с Цианин 3/5	3 ч.
3. Хибридизация	1 ч., инкубация за 40 ч.
4. Промиване	1 ч.
5. Сканиране	~30 мин. на чип

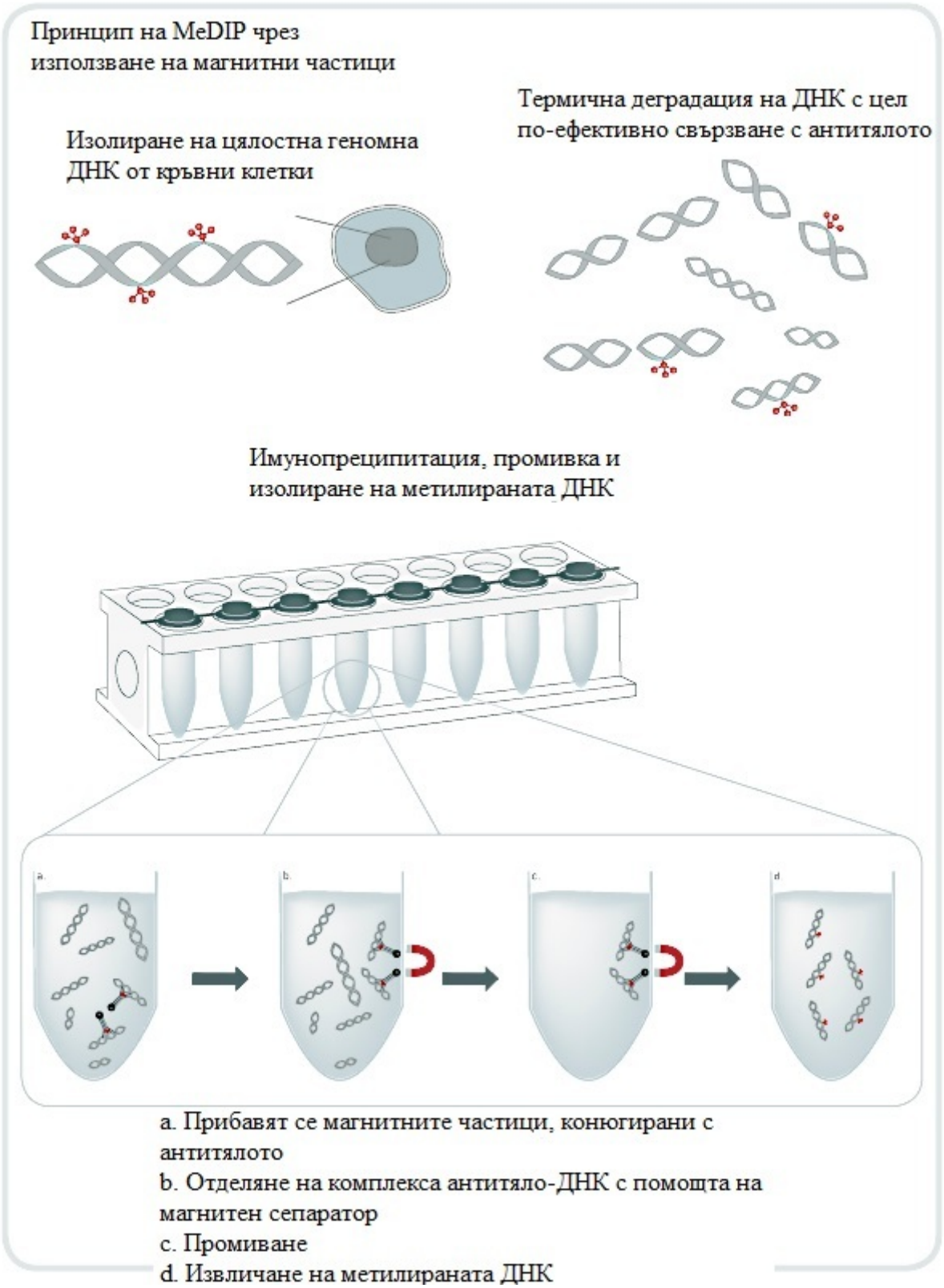
Таблица 3. Етапи на микрочиповия анализ.

Приготвяне на пробите: Изолиране на метилирана ДНК от пречистени геномни ДНК проби.

Подготовката на пробите включва няколко основни стъпки:

- Подготовка на магнитните частици;
- Подготовка на ДНК за имунопреципитация;

Подготовка на магнитните частици (Фиг. 18)



Фигура 18. Имунопреципитация с помощта на магнитни частици.

Свързването на антитялото към магнитните частици се извършва на лед.

- Преди започване на работа магнитните частици (Pan-mouse IgG Dynal (Life Technologies)) се разбъркват на вортекс, тъй като са се утаили при съхраняването. Магнитните частици са покрити с G протеин, който се използва рутинно, тъй като е лесен за употреба и има способността да свързва голям брой различни антитела. Други налични варианти са покритие от A протеин или типа на частиците (напр. агароза), но те не са валидирани за протокола на Agilent.

- 50 µL от магнитните частици се прехвърлят в 1,5mL центрофужна епруветка.

- Епруветката се поставя на магнитен сепаратор (Dynal Magnetic Particle Concentrator (product number 123- 21D)).

- След утаяването на частиците надстоящата течността се отстранява с пипета.

- Прибавят се 750 µL блокиращ разтвор 1 (1X PBS, 0.5% BSA (Sigma Electrophoresis Grade)) и внимателно се разбърква.

- Частиците се разбъркват с блокиращ разтвор 1 на ротатор (Jencons-PLS) за 5мин. на 4°C.

- Отново се поставят на магнитния сепаратор и надстоящата течност се отстранява.

- Промивката се повтаря още веднъж.

- Центрофугира се на 4°C при 1500×g за 3 мин.

- Частиците се ресуспендират в 230 µL блокиращ разтвор 2 (1X PBS, 0.05%BSA (Sigma Electrophoresis Grade)) и се прибавят 5µg от антитялото 5-метилцитозин (Eurogentec, catalog number BI-MECY- 1000), необходимо за имунопреципитация. За намаляването на циклите за размразяване и замразяване при първоначалната употреба антитялото се разделя на аликвоти от по 5 µg и се съхранява на - 20°C.

- Епруветките се поставят на ротатора за минимум 6 часа на 4°C, за да може антитялото да се свърже с магнитните частици. На тази стъпка е препоръчително пробите да престоят цяла нощ с цел по-ефективна екстракция.

- На следващия ден пробите се центрофугират за събиране на капките.
- Епруветките се поставят на магнитния сепаратор и се отстранява надстоящата течност.
- Прибавят се 750 μL от блокиращ разтвор 2.
- Пробите се отстраняват от магнитния сепаратор и внимателно се разбъркват.
- Отново се връщат на сепаратора и се отстранява надстоящата течност.
- Тази промивка се повтаря още два пъти.
- След последната промивка частиците се разтварят в 50 μL от блокиращ разтвор 2. Те вече са готови за стъпката на имунопреципитация.

Подготовка на пробите

- За всяка проба се използват по 7μg цялостна генома ДНК, разтворена в 50μL ТЕ буфер.
- Направена е оптимизация на протокола като пробите се деградират термично, а не с соникация. Всички проби се нагряват на 95°C за 45 мин.
- Степента на деградация на ДНК се определя с помощта на агарозна гел електрофореза. Необходимо е получените фрагменти да са с размер 200-1000 bp. (Фиг. 17).
- Добавят се 200 μL PBS.
- ДНК пробите се разделят като 50 μL се запазват като референтна проба, а от останалите 200 μL чрез имунопреципитация се изолира само метилираната ДНК.

Имунопреципитация

- 200 μL от разградената ДНК се прибавят към 50 μL антитяло конюгирано към магнитните частици.

- Добавят се 250 µL 2X IP буфер (0,05% Triton X-100 в PBS, 50 µg/ml tRNA от дрожди (Life Technologies cat#15401-011))
- Пробите се оставят за една нощ на ротатор на 4°C.

Промиване

- Промиването се извършва на лед.
- Епруветките се поставят на магнитния сепаратор. Надстоящата течност се отстранява с пипета.
- Добавя се 1 mL IP буфер за промиване (1% Triton X-100 в PBS). Епруветките се изваждат от магнитния сепаратор и внимателно се разбъркват.
- Пробите се поставят на ротатор за 3 мин. на 4°C.
- Епруветките се поставят на магнитния сепаратор и надстоящата течност се отстранява.
- Промивката се повтаря още два пъти. Внимателно се отстранява цялото количество останал буфер.

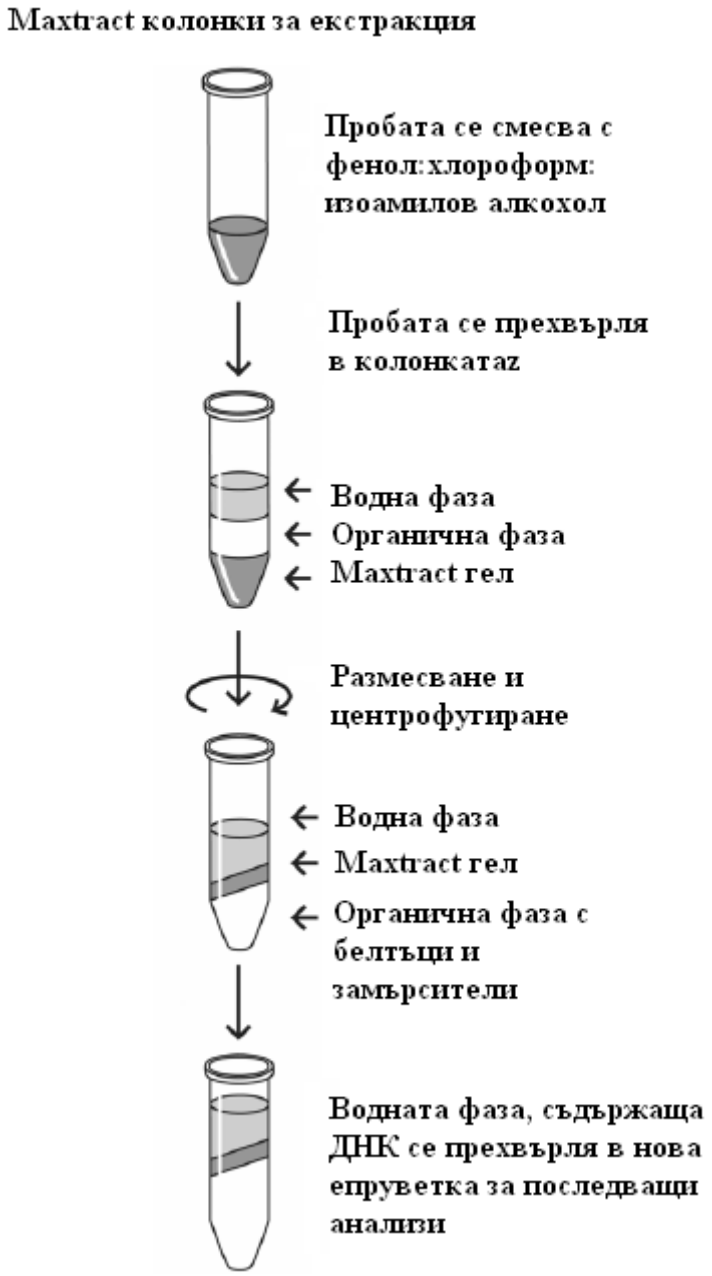
Елуиране

- Прибавят се 150 µL елуиращ буфер (1% SDS в TE буфер). Частиците се ресуспендират.
- Елуирането се извършва на водна баня на 65°C за 2,5 мин.
- Пробите се вортексират за размесване на частиците.
- Епруветките се връщат за още 2,5 мин. на 65°C.
- Епруветките се поставят на магнитния сепаратор.
- Надстоящата течност (~150 µL), съдържаща имунопреципитираната ДНК се прехвърля в нова 1,5 mL епруветка.
- Стъпката на елуиране се повтаря с още 150 µL елуиращ буфер.
- Надстоящата течност от двете поредни стъпки на елуиране се събира в една обща епруветка.

Екстракция на имунопреципитираната и референтната ДНК с фенол-хлороформ (Фиг.19)

- Добавят се 250 μL елуиращ буфер към референтните ДНК проби.

По този начин и контролните и референтните ДНК проби имат общ обем 300 μL.



Фигура 19. Пречистване на имунопреципитираната ДНК

- 1,5 mL колонки за екстракция (Maxtract high density extraction column (Qiagen catalog number 129056)) се центрофугират на 14 000× g за 30 сек. на стайна температура.
- Към всяка от пробите се прибавят 300 μL фенол:хлороформ:изоамилов алкохол.
- Пробите се размесват на вортекс за 20 сек.
- 600 μL от всяка проба се прехвърлят в съответната Maxtract колонка.
- Епруветките се центрофугират на 14 000×g за 5 мин. на стайна температура. Ако някоя от пробите остане мътна екстракцията се повтаря.
- Когато всички проби се избистрят горната водна фаза се прехвърля в нова 1,5 mL центрофужна епруветка.
- Към всяка от пробите се добавят:
    - 16 μL 5M NaCl (200 mM крайна концентрация)
    - 1,5 μL 20 μg/μL гликоген (Life Technologies)
    - 880 μL ледено-студен етанол (Merck)
- Размесват се на вортекс.
- Замразяват се на -80°C за 30 мин. или -20°C за поне 2 ч. (най-добре цяла нощ за по-голям добив).
- Епруветките се центрофугират на 20 000×g за 10 мин. на 4°C за утаяване на ДНК.
- Надстоящата течност внимателно се отстранява с пипета.
- Към утайката се добавя 500 μL 70% ледено-студен етанол.
- Пробите се центрофугират на 15 000×g за 5мин.
- Надстоящата течност отново се отстранява много внимателно с пипета. При тази стъпка от голямо значение е етанола да се премахне изцяло, за да може ДНК да се разтвори.

- Утайката се изсушава за 10 мин. на стайна температура. Времето за сушене също е много критично, тъй като ако пробите пресъхнат много трудно ще се разтворят.

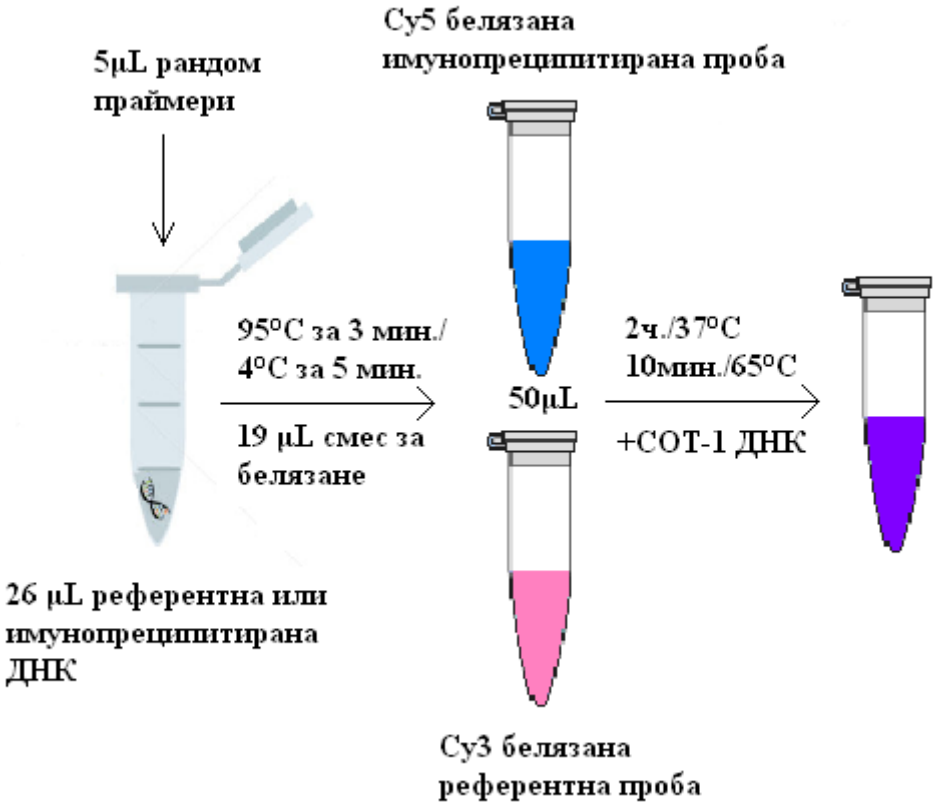
- Утайката се разтваря в 31 μL вода без нуклеази.

- Добива на имунопреципитирана и референтна ДНК се определя на спектрофотометър Nanodrop2000.

- Изследването продължава само при добив между 500 и 700 ng.

ДНК белязане с флуоресцентна боя

- Използват се случайни праймери и екзо-Klenow ензим за диференциално белязане на геномни ДНК проби с флуоресцентно белязани нуклеотиди. За прилагане на Agilent метилационна микрочипова технология, имунопреципитираната проба е маркирана с едно багрило, докато референтната проба е маркирана с друга боя. Обикновено референтната проба се бележи в зелено (Cyanine 3) и имунопреципитираната проба се бележи в червено (Cyanine 5) (Фиг.20).



Фигура 20. Белязане на имунопреципитираната и референтната ДНК.

- Cyanine 3-dUTP и Cyanine 5-dUTP са чувствителни към светлина и лесно могат да се разградят при множество цикли на замразяване и размразяване. По тази причина трябва да се сведе до минимум излагането на светлина по време на процедурата за белязане.

- Трябва да се температурират три водни бани на 95°C, 37°C и 65°C. За стъпките с нагряване може да се използват термоциклери.

- Добавят се 5μL рандом праймери във всяка реакционна епруветка, съдържаща 26 μL референтна или имунопреципитирана ДНК, за да се направи общ обем от 31μL. Разбърква се добре с пипета.

- Епруветките се поставят на нагряващ блок и се инкубират при 95°C в продължение на 3 минути, след това бързо се преместват на лед и се инкубират в продължение на 5 минути.

- Приготвя се смес за белязане, необходима за 8 реакции, която включва реакционен буфер, смес от dNTP, Cyanine 3-/5- флуоресцентно белязан dUTP, Exo-Klenow ензим (Табл. 4).

- **Таблица 4.** Смес за белязане, необходима за 8 реакции

Компоненти	**Имунопреципитирана ДНК**		**Референтна ДНК**	
	за 1 р-ия	**за 8 р-ии**	**за 1 р-ия**	**за 8 р-ии**
5x реакционен буфер	10	85	10	85
10x dNTP	5	42,5	5	42,5
Cyanine 3-dUTP (1.0 mM)			3	25,5
Cyanine 5-dUTP (1.0 mM)	3	25,5		
Exo-Klenow ензим	1	8,5	1	8,5
Краен обем	19	161,5	19	161,5

- Добавят се 19 µL от микса за белязане към всяка от епруветките, съдържащи имунопреципитираната или референтната ДНК до краен обем 50µL. Внимателно се размесват с пипета.

- Инкубират се на термоциклер за 2 часа на 37°C. Ензима се инактивира за 10мин. на 65°C.

- Белязаните проби се съхраняват на -20°C.

Пречистване и комбиниране на белязаните ДНК проби.

- Белязаните ДНК проби се прехвърлят в нови 1,5 mL епруветки.

- Прибавят се 430 µL 1X TE (pH 8,0) към всяка проба.

- За всяка белязана проба се приготвя колонка с филтър за разделяне по молекулна маса (Amicon 30kDa filter size exclusion filter)

- Белязаните проби се прехвърлят в колонките и се центрофугират за 10 мин. на 14 000×g на стайна температура.

- Преминалата през колонките течност се изхвърля и се добавят 480µL 1X TE (pH 8,0) към всяка колонка.

- Центрофугират се за 10 мин. на 14 000×g на стайна температура. Преминалата течност се изхвърля.

- Колонката се обръща и се прехвърля в нова 1,5-mL епруветка. Центрофугира се за 1 мин. на 1 000×g на стайна температура.

- Измерва се обема на всеки елуат в µL. Ако обема на пробите ≥ 42 µL трябва или да се върнат в колонките и да се центрофугират за 1 мин. на 14 000×g на стайна температура, след което да се елуират или да се концентрират с вакуумен концентратор.

- Измерва се концентрацията и инкорпорацията на белязаните проби на UV-VIS спектрофотометър NanoDrop2000. Определя се добива и специфичната активност на всяка от пробите. За последващ анализ се използват само проби, които влизат в следните граници (Табл.5):

Таблица 5. Референтни стойности за белязане на ДНК

Добив на ДНК	> 2.5 µg / р-ия (най-добре между 5 и 6 µg)
Cyanine 5	7 - 20 pmol/µg
Cyanine 3	18 - 25 pmol/µg

Определяне на добива, степента на белязане и специфичната активност:

$$\text{Степен на белязане} = \frac{340 \times \text{pmol/µL багрило}}{\text{ng/µL gDNA} \times 1000} \times 100\%$$

$$\text{Специфична активност (pmol багрило/µg gDNA)} = \frac{\text{pmol/µL багрило}}{\text{µg/µL gDNA}}$$

Специфичната активност представлява степента на белязане разделена на 0,034.

$$\text{Добив (µg)} = \frac{\text{Концентрация на DNA (ng/µL)xОбем на пробата (µL)}}{\text{1000 ng/µg}}$$

В зависимост от първоначалната концентрация на ДНК добивът може да варира между 2,5 и 10 µg. Специфичната активност (pmol/µg) на Cyanine-3 белязаните проби трябва да е между 15 и 55, докато при Cyanine-5 белязаните проби между 15-40.

- Комбинират се съответстващите имунопреципитирана и референтна ДНК до краен обем 80 µL и се прехвърлят в нова 1,5mL епруветка.

Хибридизация и промивка на микрочиповете

Белязаните ДНК проби кохибридизират върху 2-канален геномен микрочип с висока плътност. Целта на това сравнение е да се идентифицират последователности, които показват значителни разлики в нивата на хибридизация. Идентификацията на MeDIP последователности на базата на микрочипов анализ е ограничена по отношение на пробите в чипа, което намалява резолюцията [479, 480].

- Преди първа употреба се приготвя блокиращия агент (Agilent 10X Blocking Solution): прибавят се 1350 µL чиста от нуклеази вода към виалката с лиофилизиран 10X блокиращ агент (Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit) и се инкубира за 1 час на стайна температура до пълно разтваряне. Готовия разтвор се съхранява на - 20°C.

- Към комбинираните проби от имунопреципитирана и референтна ДНК от един и същ пациент се добавят Cot-1 DNA, блокиращ агент, дейонизиран формамид и хибридизационен буфер (Agilent 2X Hyb Buffer) (Табл.6):

Таблица 6. Хибридизационна смес

Компоненти	**1x формат (µL)**
Смес от Cyanine 5- и Cyanine 3- белязани gDNA	80
Cot-1 DNA	50
Agilent 10X блокиращ разтвор	52
Дейонизиран формамид	78
Agilent 2X Hyb Buffer	260

Хибридизационният буфер съдържа специален омокрящ агент, който подпомага движението на мехурчетата.

- След смесването на компонентите те се разбъркват и центрофугират за събиране на капките.
- Пробите се нагряват на 95°C за 3 мин. , след което се прехвърлят в инкубатор за 30мин. на 37°C.
- Денатурираните проби се центрофугират на 17 900×g за 1 мин. на стайна температура за охлаждане на пробите до стайна температура и събиране на капките.
- Приготвя се специално покривно стъкло (gasket slide), което се поставя в рамката на хибридизационната камера (SciGene). Върху покривното стъкло има гумен ограничител, който определя мястото за накапване на пробата.
- 490 µL от пробата се накапва върху покривното стъкло без да се преминава гумения ограничител. Върху покривното стъкло се поставя микрочипа с баркода нагоре и надписа *Agilent* надолу към пробата за хибридизация (активна страна) (Фиг. 21).



Фигура 21. Хибридизационната камера

- Хибридизационната камера се затваря и здраво се завинтва. Вертикално се обръща три пъти, за да се намокри покривното стъкло и да се раздвижат всички налични мехури. В случай, че има неподвижни мехури се почуква камерата от едната страна докато се раздвижат.

- Хибридизационната камера се поставя в хибридизационна печка и чиповете се оставят да хибридизират 40 часа на 67°C на въртящ се ротор (20 RPM).

Промивка на хибридизираните микрочипове

Хибридизираните стъкла се промиват с цел да се отстранят неспецифично свързаните белязани нуклеотиди. След изваждане на хибридизационните камери се проверява подвижността на всички мехури. Не е препоръчително едновременно да се промиват повече от 8 стъкла (Табл.7).

- От предната вечер буфер за промивка 2 се темперира на 37°C в кювета от 400 mL.

Таблица 7. Буфери за промивка

Процедура	Кювета	Буфер за промивка	Температрура	Време
Разделяне от покривното стъкло	1	Буфер за промивка 1	Стайна температура	
Първа промивка	2	Буфер за промивка 1	Стайна температура	5 мин.
Втора промивка	3	Буфер за промивка 2	37°C	1 мин.

- В кювета от 100 mL се налива буфер за промивка 1 на стайна температура, в който се разделят микрочипа и покривното стъкло.
- След това микрочиповите стъкла се прехвърлят в метална стойка в кювета с буфер за промивка 1 с магнитна бъркалка на 2-ра/3-та степен за 5мин. на стайна температура.
- Металната стойка се прехвърля в следващата кювета с буфер за промивка 2 в инкубатора на 37°C за 1 мин.
- След приключване на промивката металната стойка се изважда много бавно от кюветата (около 10-15 сек.), за да може да се отстранят всички капки от повърхността на стъклата.
- Промитите и изсушени стъкла се сканират веднага, за да се намали влиянието на околната среда върху интензитета на сигналите.

Сканиране

Сканиране на микрочиповете. Препоръчително е микрочиповете да се сканират (5um) същия ден след промивката, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Agilent метилационните микрочипове се сканират на двуканален лазерен скенер Agilent G2505C, с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер и 635 nm за червения лазер. (Фиг. 22)



Фигура 22. Лазерен скенер Agilent G2505C

Получените образи се обработват с програмите Agilent Feature Extraction 11.0.1.1 и Agilent Workbench 6.5.0.18. (Фиг. 19, 20)

- След промивката хибридизираните стъкла се сканират със скенер Agilent G2505C-scanner и Agilent Scanner Control software v8.3, които са подходящи за стъкла с плътност 1x244K. Скенер Agilent е пригоден да сканира през стъклото, т.е. от задната страна. Стъклата се поставят в държачите с „*Agilent*"баркода надолу към вътрешната страна. При тази ориентация „активната страна" на микрочипа е предпазена от потенциални увреждания или пръстови отпечатъци (Фиг. 23).



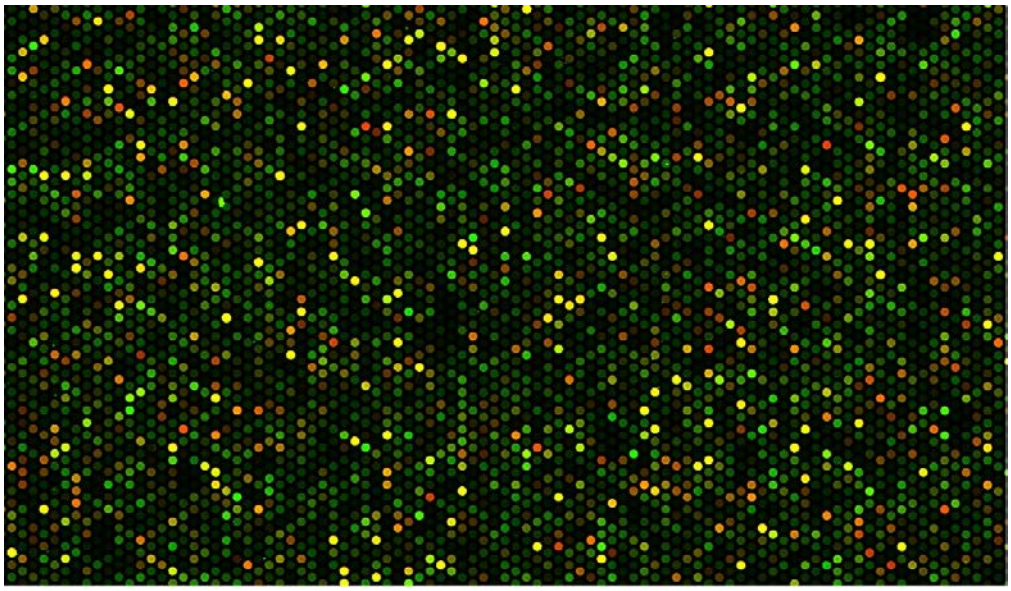
Фигура 23. Държач за стъкла

- Стъклата се поставят в специални държачи, които се слагат в ротора на скенера.
- Отбелязва се броя на анализираните стъкла.
- Сканирането се провежда на режим Profile Agilent HD_CGH за тази плътност на микрочиповете (Табл.8).
- **Настройки за сканиране:**

Таблица 8. Настройки на скенер Agilent.

Slide ID	<Auto Detect>
Channels	R+G
Scan region	Agilent HD (61 × 21.6 mm)
Resolution (μm)	3 μm за 1x1M
Tiff	16 bit
R PMT	100%
G PMT	100%
XDR	<No XDR>

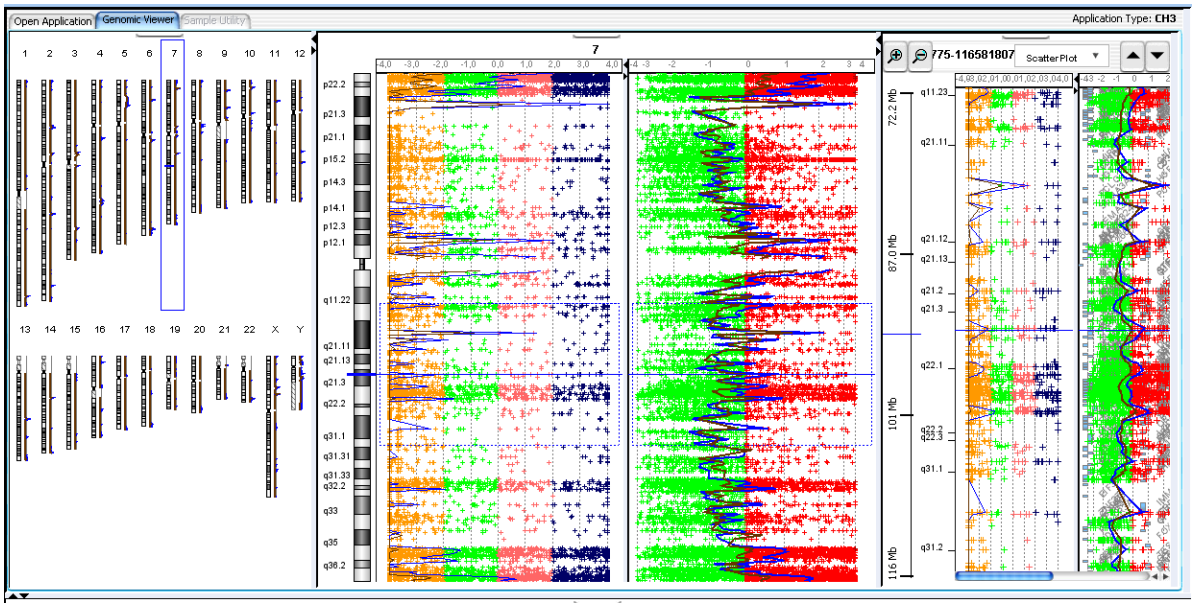
- След загряване на лазерите сканирането може да започне като за едно стъкло са необходими 15 мин.
- Получения .tif образ се обработва с програмата Feature Extraction 11.0.1.1. (Фиг. 24). За анализа са необходими специфични стойности на качествения контрол, протокол и специален шаблон за нуклеотидните последователности върху стъклото. Тези файлове са записани на диск, който се доставя със съответния каталожен номер стъкла. Софтуерът Agilent Feature Extraction 11.0.1.1 комбинира и проверява данните в областта на припокриване за съвпадение и докладва несъответствията. Всеки от микрочиповете се обработва самостоятелно.



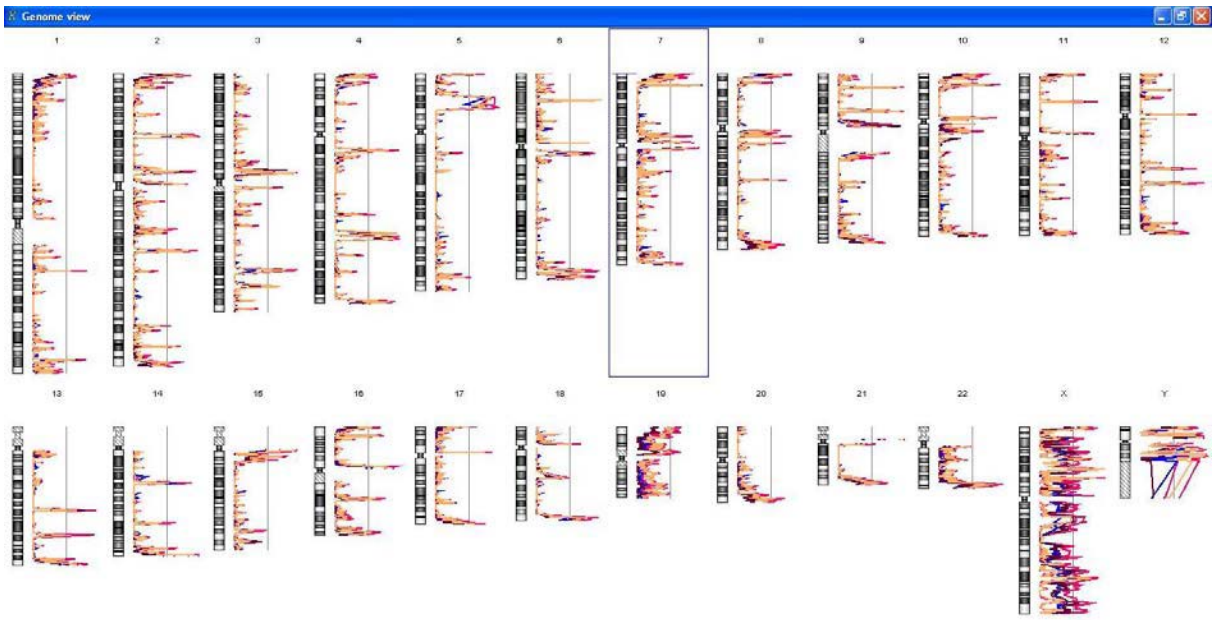
Фигура 24. Сканиран микрочипов образ.

Резултатите се представят като текстов файл, който допълнително се анализира с програма Agilent Genomic Workbench 7.0 Methylation (CH3) Analysis. Като допълнителен .pdf файл са показани стойностите за качествен контрол и границите, в които трябва да бъдат. За анализ са използвани само микрочипове, които покриват критериите за качествен контрол.

Agilent Genomic Workbench е софтуер подходящ за идентифициране и визуализация на диференциално метилирани участъци изолирани с помощта на афинитетни техники като ДНК имунопреципитация (Фиг. 25). Текстовия файл, резултат от Feature Extraction анализа се отваря с програмата Genomic Workbench. Сравняват се метилационните характеристики между два или повече микрочипа (напр. между пациенти и контроли или между пациенти преди и след лечение) (Фиг. 26). Резултатите се представят в таблица Excel, в която за всяка отделна проба на стъклото има стойност за всеки от изследваните чипове.



Фигура 25. Анализирани метилационни профили с Agilent Workbench 6.5.0.18.



Фигура 26. Разлики в метилационния профил на пациенти и контроли в целия геном.

Тъй като тези изследвания все още са нови няма разработен специализиран алгоритъм за анализ на получените данни. По тази причина в Катедрата по Медицинска генетика с помощта на софтуерен специалист е създадена програма за интерпретация на получените разлики в метилационните профили –Methylation analysis. След анализ на получените образи със специализираните програми на Agilent, резултатите се представят в таблици Excel. За всеки от пациентите и контролите, резултатите са представени с няколко параметъра - log2ratio, z-score и BATMAN (A Bayesian Tool for Methylation Analysis) [481].

Оценката на нивото на метилиране на ДНК могат да бъде сгрешени поради различната плътност на метилирани CpG сайтове в целия геном в данни, генерирани от MeDIP. Това може да бъде проблем при анализа на бедни на CpG региони (по-ниска плътност). Една от причините за този проблем е влиянието на плътността върху ефективността на имунопреципитация. В своето изследване, Down et al. [476] е разработил инструмент за оценка на абсолютните нива на метилиране в данни, генерирани от MeDIP чрез моделиране на плътността на метилираните CpG сайтове. Този инструмент се нарича Bayesian tool for methylation analysis (Batman). Проучването отчита покритието на ~90% от всички CpG сайтове в промотори, генни кодиращи региони, острови и регулаторни елементи, където нивата на метилиране могат да бъдат оценени. Това е почти 20 пъти по-добро покритие, отколкото на всички предишни методи.

По последни данни, най-подходящ статистически инструмент за анализ на MeDIP профили е използването на BATMAN критерий [476]. Той може да се прилага за големи масиви от данни, генерирани използвайки или олигонуклеотидни масиви (MeDIP-chip) или следващото поколение секвениране (MeDIP-seq), като предоставя количествена оценка на абсолютното метилационно състояние в района на интерес.

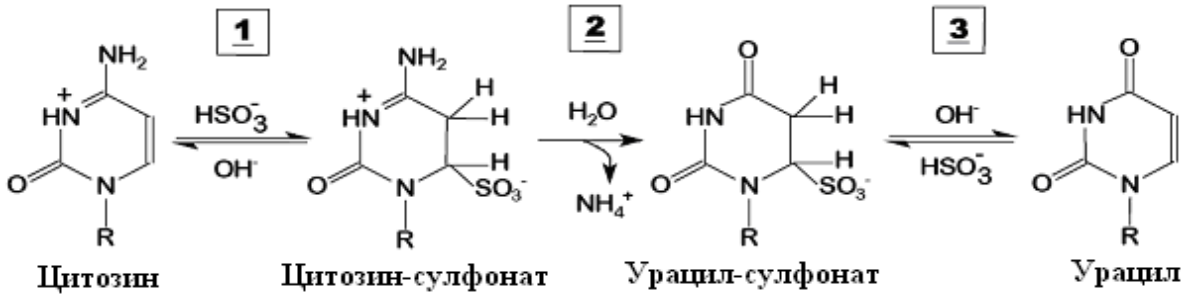
Този показател може да приема следните стойности: -1 (хипометилиран); 1 (хиперметилиран) или 0 (неинтерпретабилен). В крайния резултат за всяка анализирана позиция от чипа има данни за съответната стойност на показателя BATMAN. Тъй като ръчно извършване на анализа на 244 000 позиции за всеки пациент е изключително трудоемък и сложен процес, свързан с възможности за грешка, в Катедрата по Медицинска генетика беше разработен специален софтуер за интерпретация на получените данни. При този продукт всеки един ген се разглежда по отделно и всеки

един остров в гена също се разглежда по отделно. Изчислява се процент на хипо- или хиперметилиране. Резултатът представлява таблица, в която са сравнени всички гени и острови между 2 резултата на един пациент (преди и след лечение) или пациент/контрола и отразява само различните метилационни профили. Гени или острови, при които част от резултатите са неинтерпретабилни или съвпадат по метилационен профил се изключват от анализа.

4. Валидиране на метода на метилационния микрочипов анализ.

За валидирането на метода на метилационен микрочипов анализ са избрани CpG острови на гени, които са хиперметилирани при пациентите и хипометилирани при контролите.

Като метод за валидиране е избран метилационно-чувствителен високо-резолютивен метод на топене (MS‑HRM) при индивидуални пациенти и контроли. Той представлява лесен метод за бърз анализ на метилационният статус на специфични генетични локуси. Процедурата включва бисулфитно третиране на цялостната геномна ДНК, при което неметилирания цитозин се превръща в урацил (Фиг.27).



Фигура 27. Бисулфитно превръщане на геномна ДНК

След това с помощта на специално подбрани праймери се амплифицира интересуващия ни участък от ДНК. След провеждането на амплификацията, профилите на топене на PCR продуктите се сравняват с тези на напълно метилираната и на неметилираната референтни проби. PCR праймерите и ампликоните са подбрани според строги критерии и осигуряват необходимото ниво на чувствителност.

Първата стъпка от протокола е бисулфитната конверсия, при която неметилираните цитозини се деаминират до урацил като не се засягат метилираните

цитозини. По този начин бисулфитната конверсия променя последователността на ДНК само на базата на метилационния статус на индивидуалните нуклеотиди в геномната ДНК. Тези промени могат да се детектират с помощта на HRM анализа (Фиг. 28) [482]. Използвания за анализа кит EpiTect Fast DNA Bisulfite kit (Qiagen 59826) позволява пълно превръщане на неметилираните цитозини в урацил, като при тази реакция увреждането на ДНК се свежда до минимум.

Дизайнът на праймери за MS‑HRM е от критично значение. За целта е използвана online софтуерна програма: Methyl Primer Express v.1.0 разработена специално за дизайн на праймери за метилационни изследвания. Подбрани са няколко двойки праймери за всеки изследван участък от ДНК. Целта е да бъдат подбрани тези праймери, които са най-специфични и най-добре разграничават метилираната от неметилираната ДНК. Има три основни критерия, които трябва да се вземат предвид при дизайна на праймери: дължината на ампликона, броя на потенциалните места за метилиране в ампликона и участието на CpG динуклеотиди в секвенцията на праймера. Всеки от тези фактори може да има голямо влияние върху чувствителността на метода и в някои случаи те могат да се променят, за да открият големи или малки разлики в метилационните състояния.

Дължина на ампликона и брой на местата за метилиране

Колкото е по-голям броя на потенциалните места за метилиране в ампликона, толкова по-голяма е Tm разликата между PCR продуктите от хиперметилирани и неметилирани ДНК проби. Това прави възможно лесното различаване на профилите на топене, но може да доведе до отклонения в PCR-а. Участието на много малко CpG динуклеотиди от друга страна може да доведе до твърде еднакви профили на топене и данните да не могат да се интерпретират. Отклоненията в PCR-а се базират на наблюдения, при които ДНК фрагменти с високо съдържание на C не се амплифицират толкова ефективно колкото фрагменти с високо съдържание на U/T. След бисулфитната конверсия неметилираните участъци на ДНК ще бъдат значително набогатени с U/T нуклеотиди и може да се амплифицират с изключение на техните метилирани участъци [483]. Отклонението в PCR-а е много трудно да се предвиди. В допълнение, метилирането може да бъде хетерогенно, т.е. само някои потенциални места действително да бъдат метилирани. Трудно е да се изчислят точно стойностите на метилиране на фрагментите, получени от хетерогенно метилирани последователности.

Оптималният брой на потенциални места на метилиране в ампликоните, трябва да се определи емпирично, защото варира значително между различните геномни региони, поради причини, които не са добре изяснени. Успешните тестове MS-HRM са били публикувани с 100-200 bp ампликони и до 16 места за метилиране.

CpG динуклеотиди в PCR праймери

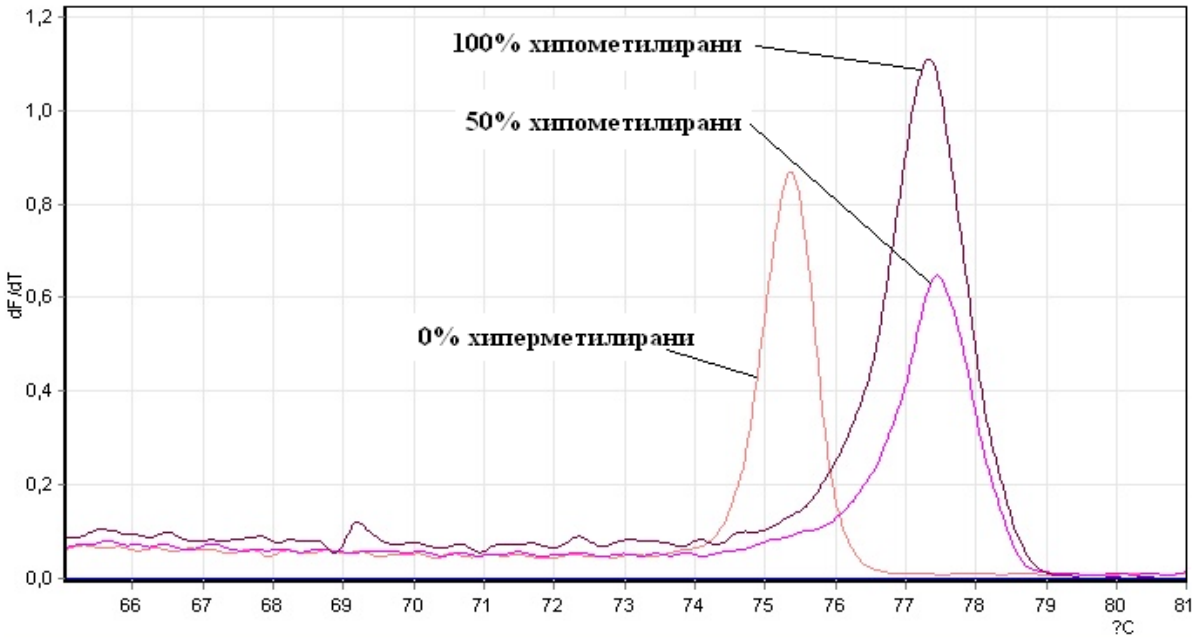
Когато е необходима максимална чувствителност за откриване на метилирани последователности, PCR праймери могат да бъдат проектирани да включват CpG динуклеотиди. По този начин неметилираната ДНК няма да съответства на PCR праймерите след бисулфитната конверсия, а метилираните фрагменти, които съответстват напълно ще бъдат значително облагодетелствани по време на PCR [484]. Когато CpG е поставен в близост до 3' края на PCR праймера, специфичността за метилирана ДНК ще бъде дори още по-голяма. Увеличаването на температурата на лепене на праймерите при PCR затруднява амплификацията със несъответстваща секвенция. Докато тази стратегия позволява откриване на много ниски нива на метилиране, способността за откриване на разлики при по-високи нива на метилиране може да бъде компрометирана.

PCR праймери , предназначени за това изследване

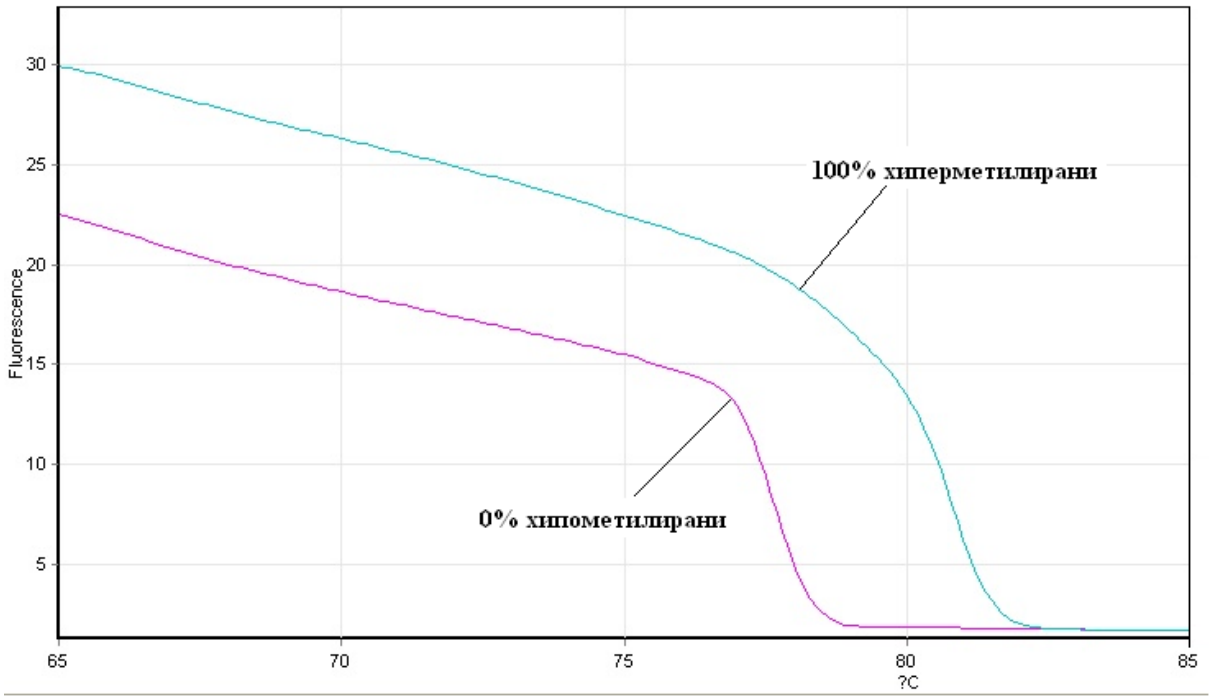
Проектирани са двойки PCR праймери с CpG динуклеотиди за чувствително откриване на метилиране в диапазона от 0% до 2% и без CpG динуклеотиди за по-универсално откриване на широко вариращ статус на метилиране от 0% до 100 %. Tm стойностите на праймерите са 58-62°C, и диапазона на размери на ампликона е 100-200 bp и включват 3-22 потенциални места на метилиране.

Оптимизиране на MS- HRM

Целта на оптимизация е да се идентифицират най-добрите PCR двойки праймери и условия на PCR-а за търсения диференциално метилиран район. Ct стойности на PCR в реално време, трябва да бъдат в интервала от 8-30 и флуоресценцията трябва значително да се увеличава през експоненциалната фаза на PCR. MS-HRM профилите на топене на 0% и 100% метилирани геномни ДНК стандарти следва да проявяват значителни различия (Фиг. 29).



Фигура 28. Представяне на MS-HRM профили.



Фигура 29. Метилационен профил на метилирана и неметилирана ДНК последователност.

MS-HRM анализ се основава на сравнение на профилите на топене на експерименталните проби към профилите от ДНК с известни нива на метилиране. Цялостно (или 100%) метилираната ДНК и неметилираната (0%) ДНК се предлагат като част от кита за PCR в реално време. 100% метилираната и 0% метилираната ДНК се смесват в определено съотношение, за да имитират ДНК проби с определени нива на метилиране на ДНК.

Бисулфитна конверсия

Неметилирана ДНК	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Метилирана ДНК	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Таблица 9. Бисулфитна конверсия

Състоянието на метилиране на ДНК последователност, най-добре може да се определи като се използва натриев бисулфит. Инкубирането на таргетната ДНК с натриев бисулфит води до преобразуване на неметилирания цитозин в урацил, оставяйки метилираните цитозини непроменени (Табл. 9). Следователно, бисулфитното третиране води до различни ДНК последователности за метилираната и неметилираната ДНК. Най-важната стъпка за правилното определяне на формата на метилиране е пълното превръщане на неметилирания цитозин. Това се постига чрез инкубиране на ДНК във високи концентрации на бисулфитни соли при висока температура и ниско pH. Тези тежки условия обикновено водят до по-висока степен на фрагментация на ДНК и последваща загуба на ДНК по време на пречистването. Пречистването е необходимо, за да се премахнат бисулфитните соли и химикали, използвани в процеса на преобразуване, които могат да инхибират последващи процедури за анализ. Повечето процедури за бисулфитно превръщане обикновено изискват големи количества изходна ДНК. Въпреки това, поради деградацията на ДНК по време на преподготовката и загуба на ДНК по време на пречистването, такива процедури често водят до нисък добив на силно фрагментирана ДНК и невъзпроизводими нива на конверсия. The EpiTect Bisulfite Kit осигурява бърза (6-часа) и рационализирана процедура за ефективно преобразуване и пречистване на около 1 ng ДНК. ДНК фрагментация по време на реакцията на бисулфитно преобразуване е възпрепятствана от специален предпазващ буфер, който съдържа багрило, имащо

ролята на pH-индикатор. То осъществява контрол при смесването на реактивите, позволяващо правилното определяне на pH за преобразуването на цитозина. PCR програмата за бисулфитна конверсия е оптимизирана за топлинна денатурация на ДНК и последващо сулфониране и цитозин дезаминиране, което позволява нива на конверсия на цитозина от над 99%. Последната стъпка в химичната конверсия е десулфониране на цитозините и се постига чрез използване на колонки в етапа на пречистване.

Принцип на метода

Процедурата включва няколко прости стъпки: бисулфит-медиирано преобразуване на неметилиран цитозин; свързване на конвертираната едноверижна ДНК към мембраната на EpiTect колонките; измиване; десулфониране на мембранно-свързаната ДНК; промиване на мембрано-свързаната ДНК за премахване на десулфониращите агенти; елуиране на чиста, конвертирана ДНК. Елуираната ДНК е подходяща за всички техники, които понастоящем се използват за анализ на метилиране на ДНК, включително PCR в реално време. Стартово количество ДНК е 2 µg DNA.

Бисулфитна конверсия на ДНК (Фиг.30)

1. Приготвя се бисулфитният микс като към всеки аликвот се добавят 800 µl, свободна от РНКаза вода и се вортексира до пълно разбъркване.

2. Подготвят се бисулфитните реакции като компонентите се смесват в посочения ред (Табл. 10):

Таблица 10. Компоненти за бисулфитна реакция

Компоненти за бисулфитната реакция	**Обем/р-ия (µl)**
ДНК + свободна от нуклеази вода	2 µg в 20 µl
Бисулфитен микс	85

ДНК предпазващ буфер	35
Общ обем	140

3. Сместа се разбърква старателно и се съхранява на стайна температура (15-25°C) докато цвета на предпазващия буфер се смени от зелено до синьо, което показва добро смесване и подходящо pH за реакцията.

4. Извършва се бисулфитно превръщане на ДНК с помощта на термоциклер с нагряващ капак (Табл.11).

Таблица 11. PCR програма за бисулфитна конверсия.

Условия за провеждане на термична бисулфитна конверсия		
Стъпка	**Време (мин.)**	**Температура (°C)**
Денатурация	5	95
Инкубиране	25	60
Денатурация	5	95
Инкубиране	85	60
Денатурация	5	95
Инкубиране	175	60
Съхранение		20

Пречистване на преобразуваната ДНК

6. Конвертираните проби се центрофугират за събиране на капките и се прехвърлят в нови 1,5 ml микроцентрофужни епруветки.

7. Добавят се 560 µl буфер BL. Разтворите се смесват чрез разбъркване и след това се центрофугира за кратко.

8. Цялата смес се прехвърля в отделна EpiTect колона.

9. Колонките се центрофугират при максимална скорост, в продължение на 1 минута. Преминалата течност се изхвърля.

10. Добавят се по 500 µl буфер BW във всяка колонка и отново се центрофугират при максимална скорост в продължение на 1 минута. Преминалата течност се изхвърля.

11. Добавят се по 500 µl буфер BD във всяка колонка и се инкубират в продължение на 15 минути при стайна температура (15-25°C). Бутилката с буфер BD и капачките на колонките трябва да се затворят веднага след употреба, за да се избегне окисляването от въглеродния диоксид във въздуха.

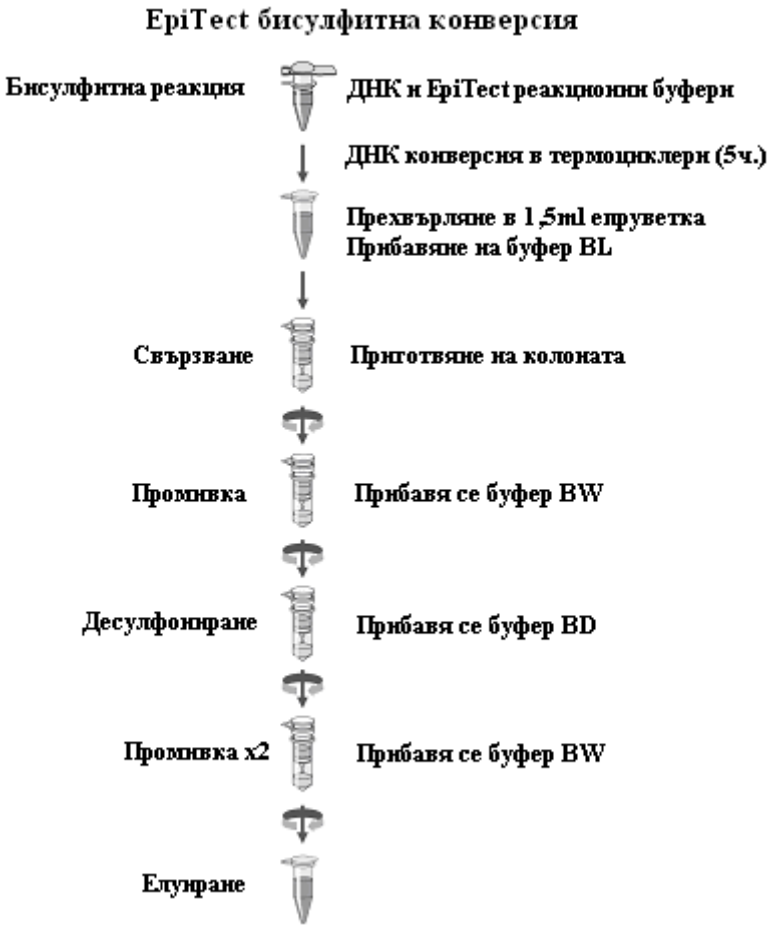
12. Колонките се центрофугират на максимална скорост в продължение на 1 минута. Преминалата течност се изхвърля.

13. Добавят се по 500 µl буфер BW във всяка колонка и отново се центрофугират при максимална скорост в продължение на 1 минута. Преминалата течност се изхвърля. Тази стъпка се повтаря още веднъж.

15. Колонките се прехвърлят в нови 2 ml епруветки и се центрофугират на максимална скорост в продължение на 1 мин., за да се отстрани остатъчна течност.

17. Колонките се прехвърлят в нови 1,5 ml микроцентрофужни епруветки. Накапват се по 20 µl буфер EB в центъра на всяка мембрана. Пречистената конвертирана ДНК се елуира чрез центрофугиране в продължение на 1 минута при приблизително 15 000x*g* (12 000 rpm). За да се увеличи добивът на ДНК в елуата, тази стъпка се повтаря с допълнителни 20 ul буфер EB.

Пречистената ДНК се съхранява при -20°C.



Фигура 30. Бисулфитна конверсия.

HRM анализ

EpiTect HRM PCR Kit осигурява удобна и лесна възможност за откриване и количествено определяне на метилираните CpG острови в преобразувана с бисулфит ДНК чрез анализ на високо резолютивно топене (HRM). HRM технологията позволява бърза характеристика на ДНК проби на базата на тяхното поведение на топене след PCR амплификация. Използва се ново флуоресцентно багрило - EvaGreen, което се свързва към двойноверижна ДНК. Това багрило е високо ефективно и не води до инхибиране на PCR амплификацията. EpiTect HRM PCR Kit позволява лесен и бърз скрининг за метилационни разлики между пробите в различни локуси.

HRM анализът е иновативна техника, която се основава на анализ на топенето на ДНК и е подходящ за изследване на бисулфитно третирана ДНК. HRM характеризира ДНК проби според тяхното поведение на дисоциация при прехода от двойно-верижна ДНК към едноверижна ДНК с повишаване на температурата.

Преди извършване на HRM анализа таргетната последователност трябва да бъде намножена в присъствието на багрилото EvaGreen. Боята не взаимодейства с едноверижна ДНК, но се свързва активно с двуверижна ДНК и флуоресцира ярко, когато е свързана. Промяната във флуоресценцията може да се използва за измерване на увеличението на концентрацията на ДНК по време на PCR и след това директно да се измери термично индуцираното топене на ДНК чрез HRM.

За да се извърши HRM анализ температурата се повишава от по-ниска към по-висока температура. Флуоресценцията на EvaGreen непрекъснато се измерва като температурата се повишава и се нанася на графика срещу температурата. EvaGreen флуоресцира докато е свързана към двойноверижната ДНК. Поради амплификацията преди HRM анализа, флуоресценцията ще бъде висока в началото на HRM анализа. При топене на двойноверижна ДНК, EvaGreen се освобождава и флуоресценцията намалява до ниво фон.

За HRM анализ са използвани праймери за CpG острови на гените *SOX3* и *ARX*. Дължината на праймерите е между 20 и 22 нуклеотида. Крайната им концентрация е 0.75 μM. Секвенцията на праймерите е (Табл.12):

Таблица 12. Секвенция на праймерите за HRM анализ.

SOX3 R	CCCCAAAACTAACTCCAATC
SOX3 F	GTAGAGGAAYGTAGTGGGAATT
ARX R	ACCTCCTTCCAAACAAAAAAAC
ARX F	GAGAATTGGGGTATTTAYGGTT

Приготвя се микс (Табл.13):

Таблица 13. Компоненти на реакция за HRM анализ.

Компоненти	Обем/25µl р-ия	Крайна концентрация
2x EpiTect HRM PCR Master Mix	12.5 µl	1x
10 µM (each) primer mix†	1.9 µl	0.75 µM и за двата праймера
ДНК + свободна от РНКази вода	10,6 µl	5–10 ng/р-ия
Краен обем	25 µl	

Настройки на Rotor-Gene Q MDx (Табл. 14):

Таблица 14. Настройки на Real-time PCR провеждане на HRM анализ.

Етап	Цикли	Време	Температура
Първоначална активираща стъпка		5 мин.	95°C
Денатурация	40	10 сек.	95°C
Хибридизация		30 сек.	55°C
Синтез		10 сек.	72°C
HRM анализ		2 сек.	65–95° C/стъпка 0.1 °C

5. Протеомен анализ

Принцип

За изолиране на белтъци кръвта се събира в пластмасови вакутейнери с червена капачка и гел за събиране на серум. Кръвта е обработвана не по-рано от 30 мин. и не по-късно от 4-6ч. след вземането. Начинът на вземане и съхраняване на материалите за

изолиране на белтъци са от голямо значение за получаване на добри резултати в последващите анализи.

Диференциална сканираща калориметрия

Диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) е високо чувствителна техника за изучаване на температурно-индуцирани конформационни преходи в биологични макромолекули/белтъци и по-комплексни структури в разтвор [485, 486]. ДСК експериментът регистрира топлинния капацитет на белтък в разтвор като функция от температурата. Процесът на нагъване на белтъка се описва със свободната енергия на Гибс (ΔG), която определя стабилността на белтъка, и към която принос имат енталпията (ΔH) и ентропията (TΔS):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

От експериментално получената калориметрична крива (която типично представлява ендотермичен пик) може да се получат всички термодинамични параметри на изследвания процес на нагъване/разгъване на даден белтък: температура на прехода T_m (температурата, при която се наблюдава максимум в кривата на топлинния капацитет), енталпия на разгъването ΔH, която е интеграл от функцията на топлинния капацитет:

$$\Delta H = \int_{To}^{Tu} cp\,dT$$

където T_0 и Tu са температурите на началото и края на прехода съответно, и Δc_P (промяната на топлинния капацитет, свързана с прехода) [487]. Освен това се счита, че ширината на полу-височината на прехода $T_{m1/2}$ е мярка за кооперативността на прехода нагънато-разгънато състояние.

Методи

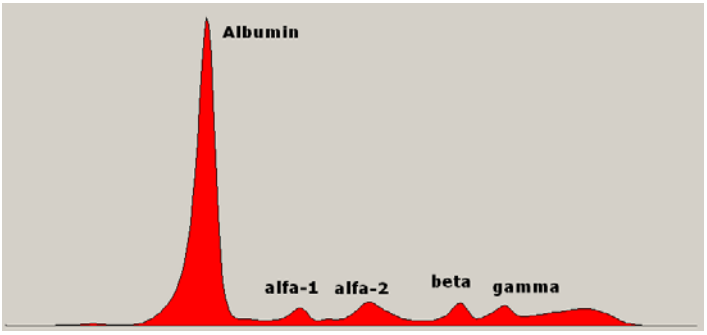
Диференциална сканираща калориметрия

Експериментите за изследване на топлинното разгъване на белтъците в кръвен серум е проведено с калориметър ДАСМ 4 (Биоприбор, Пушчино). Серумните проби се разреждат 8 пъти с буфер PBS преди всяко измерване и са сканирани в температурния интервал от 30 до 95˚С (304 до 369К) със скорост на сканиране 1˚С/мин. Термограмите са анализирани с помощта на Origin софтуерен пакет.

Електрофореза на серумни белтъци (SPEP)

Общата концентрация на белтъците се определя по метода на биурет[488]. Електрофорезата на серумните белтъци се извършва на MINICAP, Sebia Electrophoresis instrument (Фиг. 31).

Електрофорезата на серумни белтъци се използва за определяне нивата на серумни белтъци - серумен албумин, α1, α2, β1, β2 и γ глобулин и идентифициране на пациенти с нарушения на серумните белтъци. Техниката позволява разделяне на серумните белтъци на базата на техните физични свойства, а именно по отношението на техния размер/заряд, в капиляри пълни с електролит и прецизно определяне на концентрацията на по-горе посочените серумни белтъци [489].



Фигура 31. Електрофоретичен профил на серумни белтъци.

Статистически анализ на термограми на кръвна плазма/серум

За анализ на получените резултати е приложен разработеният от Fish et al. 2010 алгоритъм за анализ и класифициране на ДСК профили, приложен до момента само за лаймска болест [490]. На кратко, приема се, че специфичният топлинен капацитет на кръвен серум е нормално разпределен при здрави индивиди. Това следва от факта, че термограмата от кръвна плазма на здрави индивиди се репродуцира от тази получена чрез сумиране на термограмите на 16 от белтъците, намиращи се в най-голямо

количество в плазмата, нормирани по съответната им концентрация в серума. И второ, че концентрацията на плазмените белтъци е нормално разпределена в здравото население.

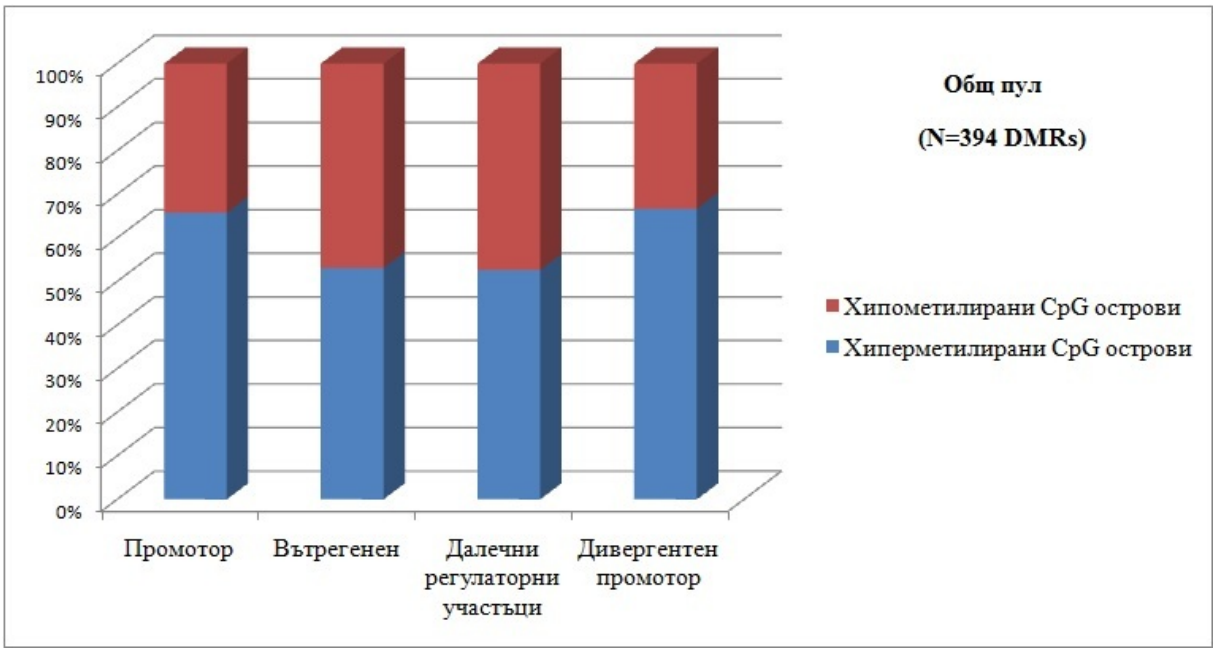
Анализът на една термограма включва сравнение на база данни от емпирични референтни термограми. Приложена е схема, при която се сравняват и класифицират термограмите в съответствие с техните форми и характерни модели. Прилаганите статистически методи изпълняват няколко основни задачи: (1) статистическа характеристика на голям брой подобни ДСК термограми, за да бъдат използвани като сравнителни референтни групи; 2) сравнение на получените термограми (наречени криви за тестване) с набор от референтни криви и количествено определяне на степента на сходство или разлика между тест-кривите и референтните криви, и (3) класификация на тест термограмата.

Определени са два параметъра - метрично разстояние (P) и коефициент на корелация (r), комбинацията между които представлява "метрично сходство" (ρ). То може да се използва за класифициране на непознати/неидентифицирани термограми в предварително характеризирани категории (спрямо дадена референтна група) [490].

V. Резултати

1. Цялостно геномно метилационно профилиране при пациенти с шизофрения, сравнени със здрави контроли

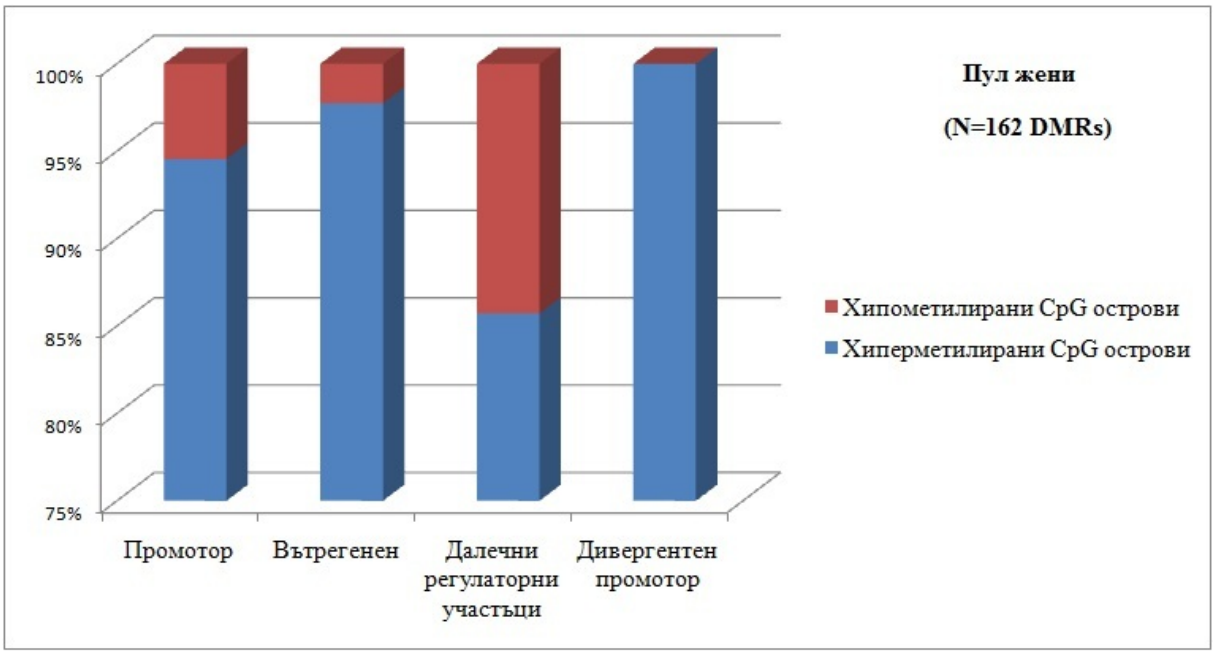
Според литературни данни, островът се определя като „хипер- или хипометилиран“ при наличие на повече от 60% от съответния метилационен статус на анализираните секвенции в острова (BATMAN коефициент съответно 1 или -1). На базата на този критерий са сравнени данните от анализа на сборни ДНК проби от пациенти и контроли (220 пациенти с шизофрения и 220 здрави контроли). В резултат са установени 394 различно метилирани участъци от ДНК (DMR-и). Резултатите от сравнението на данните получени при анализа на сборните ДНК проби от пациентите и контролите са представени на фиг. 32. Най-много CpG острови с променен метилационен профил са разположени вътрегенно (211) като 112 от тях са хиперметилирани и 99 са хипометилирани. По отношение на промоторите са намерени общо 146 острови с DMR-и (96 – хиперметилирани и 50 – хипометилирани). В далечните регулаторни участъци и дивергентните промотори съответно броя на CpG островите с разлика в метилационния статус е значително по-малък - 19 (10 хиперметилирани и 9 хипометилирани) и 18 (12 хиперметилирани и 6 хипометилирани).



Фигура 32. Разпределение на DMR-ите в зависимост от метилационния статус и местоположението на CpG острова при сборни ДНК проби от пациенти с шизофрения и здрави контроли.

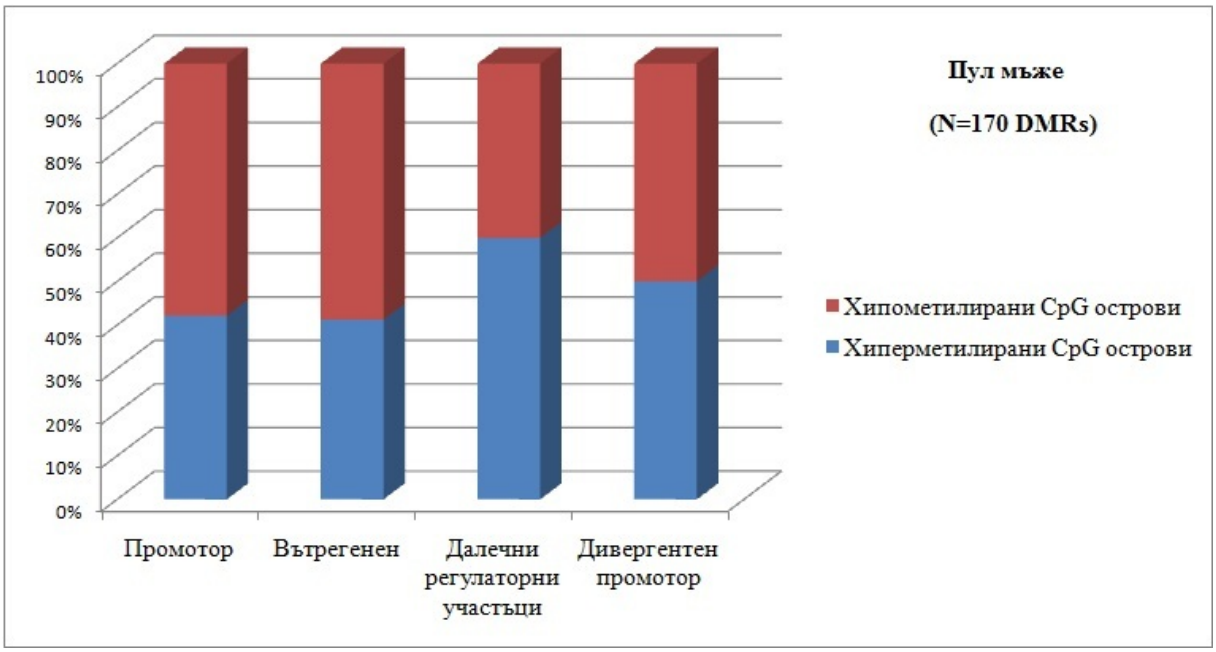
При сравняването на разделените по пол сборни проби от пациенти с шизофрения (110 пациенти жени и 110 пациенти мъже) и здрави контроли (110 жени и 110 мъже) са намерени 170 DMR-и при мъжкия пол и 162 DMR-и при женския пол. Резултатите от анализа на разделените по пол сборни ДНК проби от пациенти и контроли са представени на фиг. 33 и 34.

При сравняването на пуловете от пациенти и контроли от женски пол се установява значително по-голям брой на хиперметилираните спрямо хипометилираните CpG острови (156 спрямо 6). Отново най-силно са засегнати вътрегенните (86/2). В промоторните области се установяват 52 хиперметилирани и 3 хипометилирани острова. В далечните регулаторни участъци и дивергентните промотори съответно броят на CpG островите с промяна в метилационния статус е значително по-малък – съответно 7 (6 хиперметилирани и 1 хипометилиран) и 12 хиперметилирани.



Фигура 33. Разпределение на DMR-ите в зависимост от метилационния статус и местоположението на CpG острова при сборни ДНК проби от пациенти жени с шизофрения и здрави контроли.

При сравняването на метилационните профили на пациенти и контроли от мъжки пол установихме приблизително двойно по-голям брой вътрегенно разположени CpG острови с променен метилационен статус. Хиперметилирани са 40 вътрегенни и 24 промоторно разположени острови, докато 57 вътрегенни и 33 промоторно разположени острови са хипометилирани. В далечните регулаторни участъци и дивергентните промотори съответно броят на CpG островите с промяна в метилационния статус е значително по-малък – 10 (6 хиперметилирани и 4 хипометилирани) и 6 (3 хиперметилирани и 3 хипометилирани).



Фигура 34. Разпределение на DMR-ите в зависимост от метилационния статус и местоположението на CpG острова при сборни ДНК проби от пациенти мъже с шизофрения и здрави контроли.

В следващия етап от анализа са сравнени по между им резултатите, получени от трите анализа на сборни проби. Установено е съвпадение на 36 DMR-и при сравняване на DMR-ите открити при сравнение на общия пул пациенти с шизофрения и общия контролен пул (n=394) с DMR-ите открити при сравнение на данните от мъжкия пул пациенти и мъжкия контролен пул (n=170). Островите на 23 от тях са метилирани в една и съща посока (хипо- или хиперметилирани), докато останалите 13 CpG острова са метилирани в различни посоки (един и същ остров при единия от пуловете е хиперметилиран докато при другия пул е хипометилиран). Поради различните профили на метилиране при 13 от островите те отпадат от последваща интерпретация, тъй като

техния метилационен статус не е от значение за етиологията и патогенезата на заболяването. От останалите 23 DMR-и, 10 се намират в промоторните участъци на гените, докато останалите 13 са разположени в самите гени (Табл. 15).

Таблица 15. Различно метилирани острови между общия пул пациенти с шизофрения към общия контролен пул (n=394), сравнени с различно метилираните региони от мъжкия пул и мъжкия контролен пул (n=170).

	Име на гена	Общ пул	Пул мъже
1	ACY1	Хиперметилиран	Хиперметилиран
2	EVC2	Хиперметилиран	Хиперметилиран
3	GABRA2	Хиперметилиран	Хиперметилиран
4	SFXN1	Хиперметилиран	Хиперметилиран
5	NHP2	Хиперметилиран	Хиперметилиран
6	USP28	Хиперметилиран	Хиперметилиран
7	MGC16384	Хиперметилиран	Хиперметилиран
8	SLMO1	Хиперметилиран	Хиперметилиран
9	LIN7B	Хиперметилиран	Хиперметилиран
10	ZNF175	Хиперметилиран	Хиперметилиран
11	IL17REL	Хиперметилиран	Хиперметилиран
12	CASP3	Хиперметилиран	Хипометилиран
13	RBM4B	Хиперметилиран	Хипометилиран
14	GABRG3	Хиперметилиран	Хипометилиран
15	OPA3	Хиперметилиран	Хипометилиран
16	ADAR	Хипометилиран	Хиперметилиран
17	SCUBE3	Хипометилиран	Хиперметилиран
18	UNC5D	Хипометилиран	Хиперметилиран
19	ENHO	Хипометилиран	Хиперметилиран
20	SCARB1	Хипометилиран	Хиперметилиран
21	CCDC64B	Хипометилиран	Хиперметилиран
22	BCAR1	Хипометилиран	Хиперметилиран
23	TNK1	Хипометилиран	Хиперметилиран
24	CST3	Хипометилиран	Хиперметилиран
25	PYGO2	Хипометилиран	Хипометилиран
26	TRAF3IP1	Хипометилиран	Хипометилиран
27	CCDC110	Хипометилиран	Хипометилиран
28	GABBR1	Хипометилиран	Хипометилиран
29	ZBTB12	Хипометилиран	Хипометилиран
30	DACT2	Хипометилиран	Хипометилиран
31	NEFL	Хипометилиран	Хипометилиран
32	CCDC81	Хипометилиран	Хипометилиран

33	FA2H	Хипометилиран	Хипометилиран
34	LOC404266	Хипометилиран	Хипометилиран
35	HRNBP3	Хипометилиран	Хипометилиран
36	CCDC106	Хипометилиран	Хипометилиран

Островите с различен метилационен статус (DMR) в общия пул от пациенти с шизофрения и общия пул здрави контроли (n=394) са сравнени с разликите между пула от жени пациенти и пула от жени здрави контроли (162 DMR-и). Установени са 25 общи DMR-и, които в последствие ще бъдат разгледани за възможното им участие в етиопатогенезата на заболяването. От тези 25 общи DMR-и 11 са метилирани в една и съща посока (хипо- или хиперметилирани) - 2 са разположени в промоторните области и 6 във вътрешността на гена. Останалите 14 от 25 DMR-и са с различен метилационен статус (Табл.16).

Таблица 16. Различно метилирани острови между общия пул от пациенти с шизофрения и общия пул здрави контроли (394 DMR-и), сравнени с различно метилираните региони между пула от жени пациенти и пула от жени здрави контроли (162 DMR-и).

	Име на гена	Общ пул	Пул жени
1	SKI	Хиперметилиран	Хиперметилиран
2	VSTM2A	Хиперметилиран	Хиперметилиран
3	LMTK2	Хиперметилиран	Хиперметилиран
4	PAPSS2	Хиперметилиран	Хиперметилиран
5	USP28	Хиперметилиран	Хиперметилиран
6	CCDC64B	Хиперметилиран	Хиперметилиран
7	FA2H	Хиперметилиран	Хиперметилиран
8	HCRT	Хиперметилиран	Хиперметилиран
9	RASIP1	Хиперметилиран	Хиперметилиран
10	CACNA1I	Хиперметилиран	Хиперметилиран
11	MACF1	Хипометилиран	Хиперметилиран
12	PROX1	Хипометилиран	Хиперметилиран
13	CASP3	Хипометилиран	Хиперметилиран
14	C6orf57	Хипометилиран	Хиперметилиран
15	PTPRN2	Хипометилиран	Хиперметилиран
16	NKAIN3	Хипометилиран	Хиперметилиран
17	PRTFDC1	Хипометилиран	Хиперметилиран

18	UTF1	Хипометилиран	Хиперметилиран
19	SLC26A10	Хипометилиран	Хиперметилиран
20	LTA4H	Хипометилиран	Хиперметилиран
21	NPTN	Хипометилиран	Хиперметилиран
22	ZNF781	Хипометилиран	Хиперметилиран
23	CCDC106	Хипометилиран	Хиперметилиран
24	GSPT2	Хипометилиран	Хиперметилиран
25	SOST	Хипометилиран	Хипометилиран

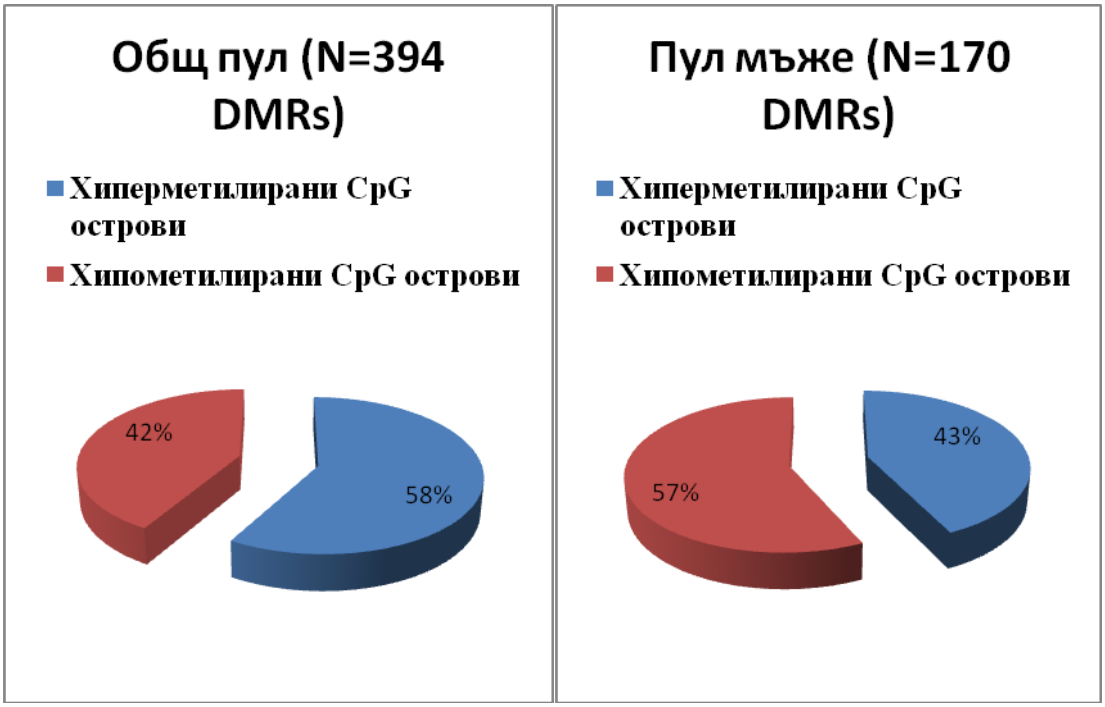
В литературата има множество статии, които показват, че хиперметилирането на CpG островите в промоторните региони на гените оказва негативен ефект на нивото на генна експресия. До момента интерпретацията на ефекта от метилирането на CpG островите вътре в гена или в други регулаторни области не е определено еднозначно и трябва да се тълкува въз основа на всеки отделен случай. Според някои автори метилирането на тези острови потиска генната експресия, докато други автори предполагат активираща функция [491, 492].

В трите изследвани групи пациенти (общ пул от пациенти с шизофрения, пул от мъже пациенти и пул от жени пациенти с шизофрения) повечето от DMR-ите са разположени вътрегенно. При сравнение на пуловете от жени пациенти и жени контроли е установен значително по-голям брой хиперметилирани CpG острови отколкото хипометилирани CpG острови (96,3% спрямо 3,7%) (Фиг. 35).



Фигура 35. Разпределение на DMR-ите (%) в пула жени според метилационния статус.

За разлика от пула жени, при общия пул и пула мъже хипо- и хиперметилираните острови са представени сравнително равномерно (42%/58% и 57%/43%) (Фиг. 36).



А Б

Фигура 36. Разпределение на DMR-ите (%) в общия пул (А) и пула мъже (Б) според метилационния статус.

Благодарение на използването на софтуера Biograph (www.biograph.be) приоритетно са подбрани гените, които биха могли да имат отношение към шизофренията. Таблица 17 показва най-добрите 10 кандидат гени с променен метилационен профил в общия пул.

Таблица 17. Топ 10 гени с DMR-и, избрани от софтуера Biograph при пациенти с шизофрения

Топ 10 гени с DMR-и при пациенти с шизофрения					
Име на гена	CpG остров	Хромозома	Цитолента	Локализация	Метилационен статус (%)
HRH1	CpG: 83	chr3	p25.3	Промотор	Хипер(60%)
GABRA2	CpG: 65	chr4	p12	Промотор	Хипер (67%)
LIN7B	CpG: 115	chr19	q13.33	Промотор	Хипер (60%)
MYLIP	CpG: 113	chr6	p22.3	Промотор	Хипер (63%)
NXPH3	CpG: 32	chr17	q21.33	Промотор	Хипер (67%)
HMOX1	CpG: 34	chr22	q12.3	Промотор	Хипо (75%)
CRMP1	CpG: 137	chr4	p16.2	Промотор	Хипо (60%)
FGFR1	CpG: 170	chr8	p11.22	Вътрегенно	Хипер (63%)
CASP3	CpG: 59	chr4	q35.1	Вътрегенно	Хипер (60%)
MACF1	CpG: 78	chr1	p34.3	Вътрегенно	Хипо (60%)

Повечето от CpG островите са разположени в региона на генния промотор (7 от 10 CpG острови). Пет от островите, разположени в промотора са хиперметилирани докато два от островите са хипометилирани. Смята се, че хиперметилиране в промоторните региони на гените води до инхибиране на експресията, докато хипометилирането в тези области активира генната експресия [491]. Според това твърдение се предполага, че експресията на повечето от 10-те най-добри кандидат-гени е потисната. Само три от топ 10-те CpG острови са разположени във вътрешността на самите гени. Два от тях са хиперметилирани, докато един е хипометилиран. Същинската функция на ДНК метилирането в области, различни от промоторните, все още е нееднозначно уточнена [491, 492]. По тази причина само може да се предполага за посоката на влияние на метилирането върху генната експресия. При сравнението на пациентите от общия пул с общия пул от здрави контроли са намерени само два гена (*FGFR1* и *HRH1*) от 394 асоциирани с различно метилирани региони, които имат връзка със заболяването според базата данни на софтуера Biograph. Останалите гени се представят от софтуера като вероятно-асоциирани. Генът *GABRA2* играе роля в инхибиторната невротрансмисия, но се определя като вероятно асоцииран по отношение на развитието на шизофрения съгласно софтуера Biograph [493].

2. Разлики в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола

Известно е, че съществуват различия между половете по отношение на метилационния статус [494, 495]. По тази причина са изследвани разликите в метилационния профил в разделени по пол пулове от пациенти и контроли. Таблица 18 показва 10-те най-добри кандидат-гени с DMR-и, подбрани от софтуера Biograph за асоциация с шизофрения от 170 гени с различен профил на метилиране в пул от пациенти мъже, сравнен с пул от мъжки контроли. Таблица 19 показва топ 10 от 162 гена с различен метилационен профил в пул от пациенти жени с шизофрения, сравнени с жени здрави контроли.

Таблица 18. Топ 10 гени с DMR-и (избрани от софтуера Biograph) при мъже пациенти с шизофрения и разпределението им в индивидуални проби.

Топ 10 гени с DMR-и при 110 пациенти мъже с шизофрения, сравнени със здрави контроли мъже					
Топ 10 гени с DMR-и в мъжкия пул	DMR-и в индивидуални пациенти мъже (n=12)	%	CpG остров	Локализация	Метилационен статус (%)
GABRA2	3	23	CpG: 65	Промотор	Хипер (83%)
LIN7B	6	46	CpG: 115	Промотор	Хипер (60%)
MIR193B	2	23	CpG: 123	Промотор	Хипер (63%)
MIR181C	6	38	CpG: 117	Промотор	Хипо (63%)
DNMT3A	5	38	CpG: 61	Вътрегенно	Хипер (60%)
CASP3	3	23	CpG: 59	Вътрегенно	Хипер (60%)
DHX37	7	62	CpG: 35	Вътрегенно	Хипо (80%)
GIPC1	7	54	CpG: 59	Вътрегенно	Хипо (67%)
MAP2K2	8	62	CpG: 83	Вътрегенно	Хипо (60%)

FNDC4	7	62	CpG: 59	Вътрегенно	Хипо (60%)

Четири от гените показват диференциално метилиране в промоторните CpG острови. Три от тях са хиперметилирани и един е хипометилиран. Останалите шест CpG острова са разположени вътрегенно. Три от топ 10 гените с DMR-и в пула от мъже са идентични с топ 10 гените в общия пул и също са хиперметилирани: *GABRA2, LIN7B, CASP3.*

Таблица 19. Топ 10 гени с DMR-и (избрани от софтуера Biograph) при жени с шизофрения и разпределението им в индивидуални проби.

Топ 10 гени с DMR-и при 110 пациенти жени с шизофрения, сравнени със здрави контроли жени					
Топ 10 гени с DMR-и в женския пул	DMR-и в индивидуални пациенти жени (n=8)	%	CpG остров	Локализация	Метилационен статус (%)
GABRD	5	57	CpG: 117	Промотор	Хипер (60%)
GNAQ	2	14	CpG: 167	Промотор	Хипер (60%)
PTK2	1	14	CpG: 170	Промотор	Хипер (63%)
XIAP	7	86	CpG: 70	Промотор	Хипер (80%)
PRKACA	4	43	CpG: 80	Промотор	Хипо (60%)
CASP3	1	14	CpG: 59	Вътрегенно	Хипер (60%)
OXT	5	57	CpG: 105	Вътрегенно	Хипер (75%)
MACF1	4	43	CpG: 78	Вътрегенно	Хипер (80%)
PPP2R2A	3	29	CpG: 56	Вътрегенно	Хипер (60%)
KRT7	5	57	CpG: 89	Далечни регулаторни елементи	Хипер (60%)

Данните показват, че пет от всички CpG острови са разположени в областта на промотора, четири са вътрегенни и един е разположен дистално от промотора - в

далечни регулаторни последователности. Повечето от CpG островите в женския пул са хиперметилирани (9 от 10). Два от топ 10 гените с DMR-и са идентични с топ 10 гените от общия пул: *CASP3, MACF1*. *MACF1* генът има DMR, който в пула от жени е хиперметилиран, докато в общия пул е хипометилиран. По тази причина този ген е изключен от анализите, тъй като метилационният му статус не е от значение за етиопатогенезата на заболяването. В пула от пациенти мъже CpG острова на този ген не показва променен метилационен профил в сравнение с пула от здрави контроли мъже. В топ 10 гените с DMR-и в женския пул само за *GABRD* гена е доказана асоциация с шизофрения [496] според софтуера Biograph.

Между топ 10 гените с DMR-и от трите изследвани пула има само един общ ген:*CASP3*.

3. Потвърждаване на различията от цялостния геномен метилационен пул анализ при индивидуални пациенти

За потвърждаване на данните от специфични по пол пулове е извършен индивидуален анализ на 8 женски и 12 мъжки проби от пациенти с шизофрения. Пробите от индивидуалните пациенти са сравнени със съответния по пол пул от здрави контроли.

Последващият етап от анализа се състои в проверка на метилационния статус на топ 10 гените с DMR-и получени при анализа на пул-пробите от женски пол измежду гените с DMR-и, получени след сравнение на индивидуалните пациенти жени с контролния пул жени. Всички топ 10 гени с DMR-и получени при анализа на женския пул са открити при между една и седем от индивидуалните пациентки. Промяната в метилационния профил на тези гени при индивидуалните пациенти съвпада по посока както между тях така и с пула жени (Таблица 18). При най-много от жените (7 от 8 пациентки) се среща DMR в промотора на *XIAP* гена. Още три DMR-а в *GABRD, OXT* и *KRT7* гените се откриват в 5 от 8 анализирани жени пациенти с шизофрения. Поради това се предполага, че тези гени са силни кандидати за биомаркери при шизофрения. Тези резултати потвърждават данните, получени от анализа на пулове и дават възможност пуловете да бъдат използвани като средство за епигенетични анализи.

При цялостния геномен метилационен анализ на дванадесетте индивидуални проби от пациенти мъже е установено наличието на всички 10 най-добри кандидат-гени, асоциирани с DMR-и, специфични за мъжкия пул. Тези топ 10 гени се срещат в между две и осем индивидуални проби от мъже пациенти с шизофрения (Таблица 19). CpG островите, които са с различен метилационен профил, имат една и съща локализация и метилационен статус, както при индивидуалните пациенти, така и при пула мъже. Генът *MAP2K2* се среща при 8 от 12 анализирани пациенти. Три от гените с различно метилирани области - *DHX37, GIPC1* и *FNDC4* – се откриват при 7 от 12 пациенти.

Данните, получени при сравняването на индивидуалните пациенти потвърждават в голяма степен резултатите от анализа на специфичните по пол пулове. Получените резултати показват, че разделените по пол пулове са по-информативни от общите, смесени пулове и са по-подходящи и достоверни при определяне на нови биомаркери при заболявания, имащи диференцирани характеристики при двата пола.

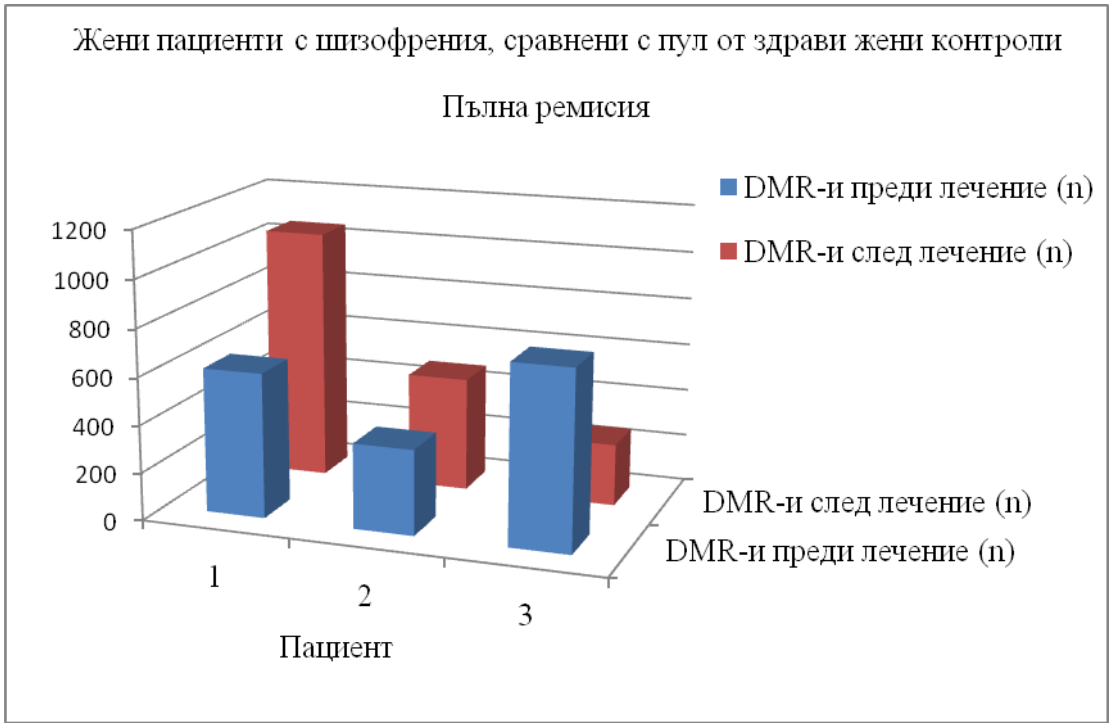
4. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения

Събрани са кръвни проби от 20 пациента с шизофрения след проведено специализирано стандартизирано интервю с психиатър. На същите пациенти е взета втора кръвна проба около три месеца след първата, на фона на активна медикаментозна терапия. Проведено е второ интервю с психиатър за определяне на ефекта от лечението. От двете кръвни проби на всеки от 20-те пациента е изолирана цялостна геномна ДНК и е проведен метилационен микрочипов анализ. Метилационният статус на 20-те пациенти с шизофрения (8 жени и 12 мъже) е определен след анализ на 40 отделни метилационни микрочипа: 20 за пациентите преди лечение и 20 за същите пациенти след лечение. Като контрола за сравнение са използвани пулове от здрави контроли, съответстващи по пол (110 здрави контроли жени и 110 здрави контроли мъже). Отново се прилагат същите критерии за анализ: ако повече от 60% от острова е хиперметилиран той се определя като „хиперметилиран", ако по-малко от 40% от острова е хиперметилиран, то той се приема за „хипометилиран" и ако стойностите на метилиране на острова са между 40% и 60%, то той се изключва от анализа като неинтерпретабилен. Според тези критерии за анализ са сравнени метилационните профили на пациентите преди лечение с метилационния профил на здравите контроли,

както и метилационните профили на същите пациенти след лечение с този на здравите контроли. В зависимост от пола и ефекта от лечението пациентите са разделени в четири групи:

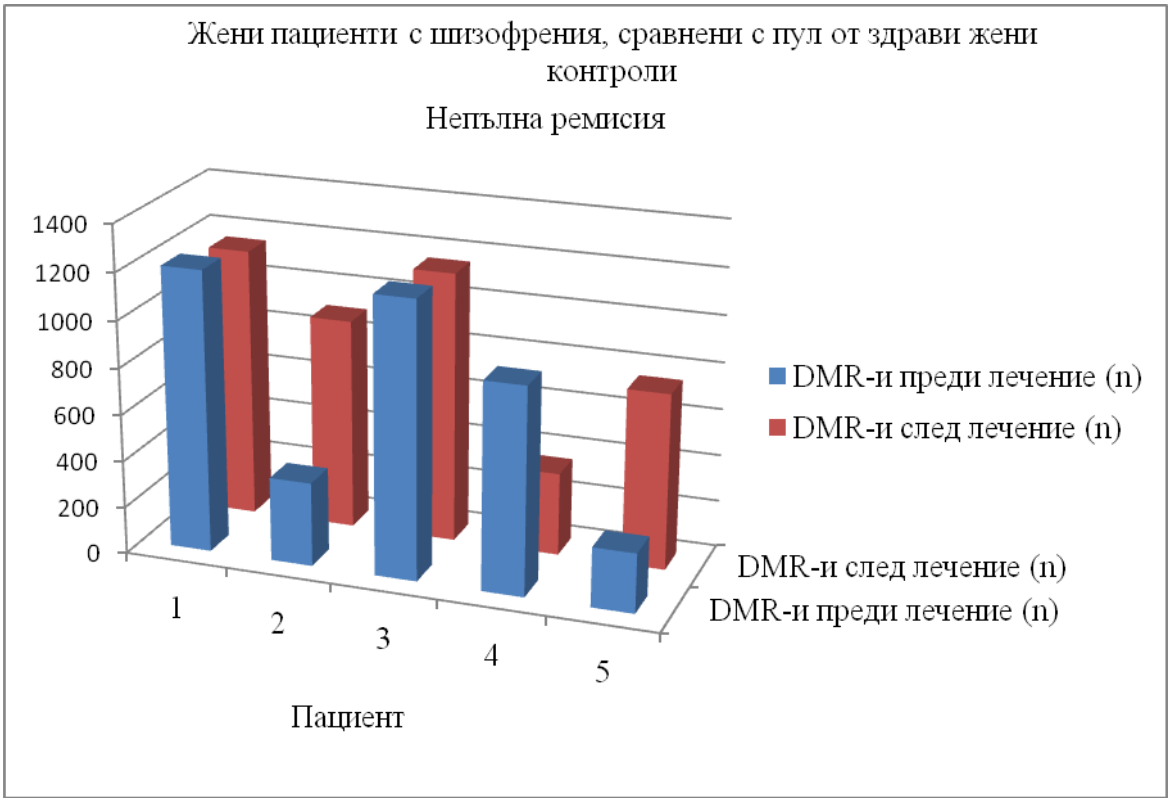
1. Жени пациенти с шизофрения с пълна ремисия - 3 пациенти;
2. Жени пациенти с шизофрения с непълна ремисия - 5 пациенти;
3. Мъже пациенти с шизофрения с пълна ремисия - 3 пациенти;
4. Мъже пациенти с шизофрения с непълна ремисия - 9 пациенти.

При всеки пациент във всяка от групите е определен броят DMR-и (между 255 и 1648). Резултатите от този анализ са показани на фигура 37. В групата на жени пациенти с шизофрения сравнени със здрави контроли при една от пациентките се установява увеличаване на броя на DMR след провеждане на лечение. При друга пациентка от същата група се наблюдава понижение на броя на DMR след лечение, докато при третата няма значителна промяна в резултат от терапията.



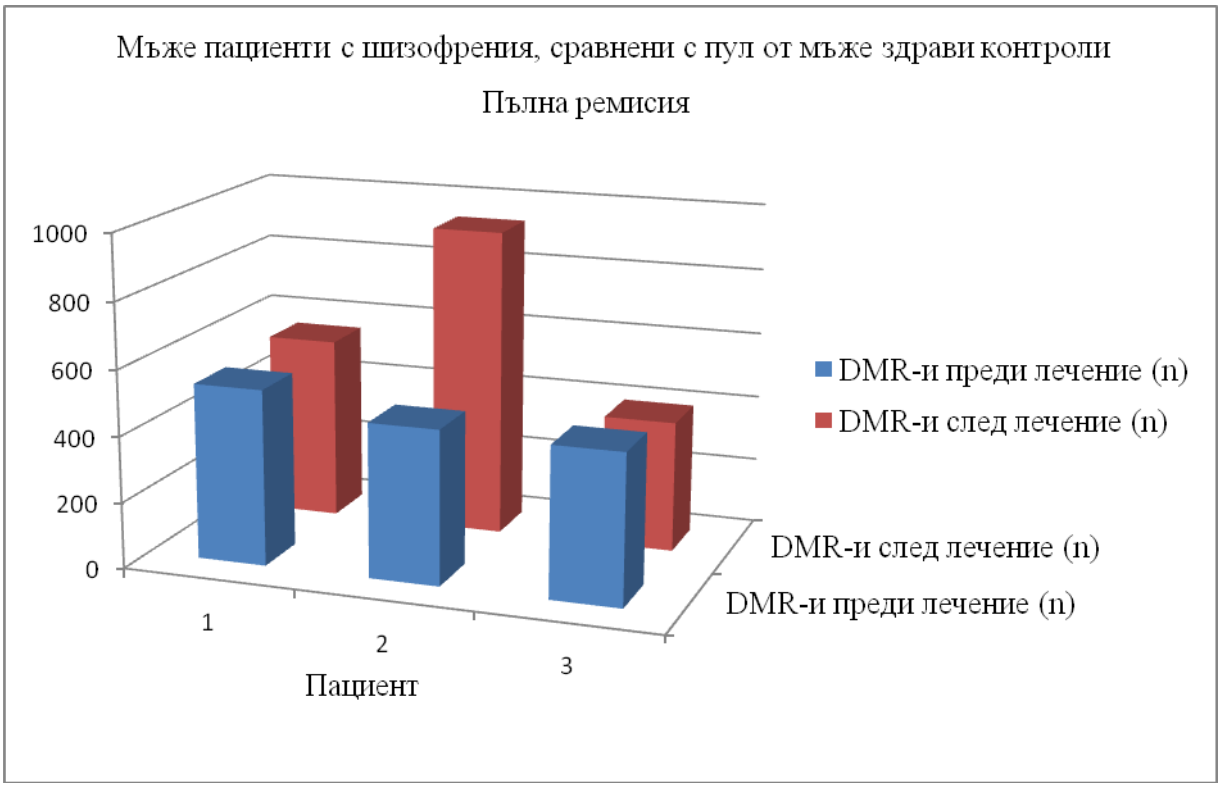
Фигура 37. Брой на DMR-ите при жени с шизофрения в пълна ремисия преди и след лечение.

В групата от пациенти жени в непълна ремисия попадат 5 пациента. При две от пациентките се наблюдава значително по-голям брой DMR в сравнение с останалите от групата, като този брой е приблизително еднакъв преди и след лечение. При две от останалите три пациентки се наблюдава повишаване на броя DMR-и след провеждане на лечението, докато при третата този брой намалява (Фиг. 38).



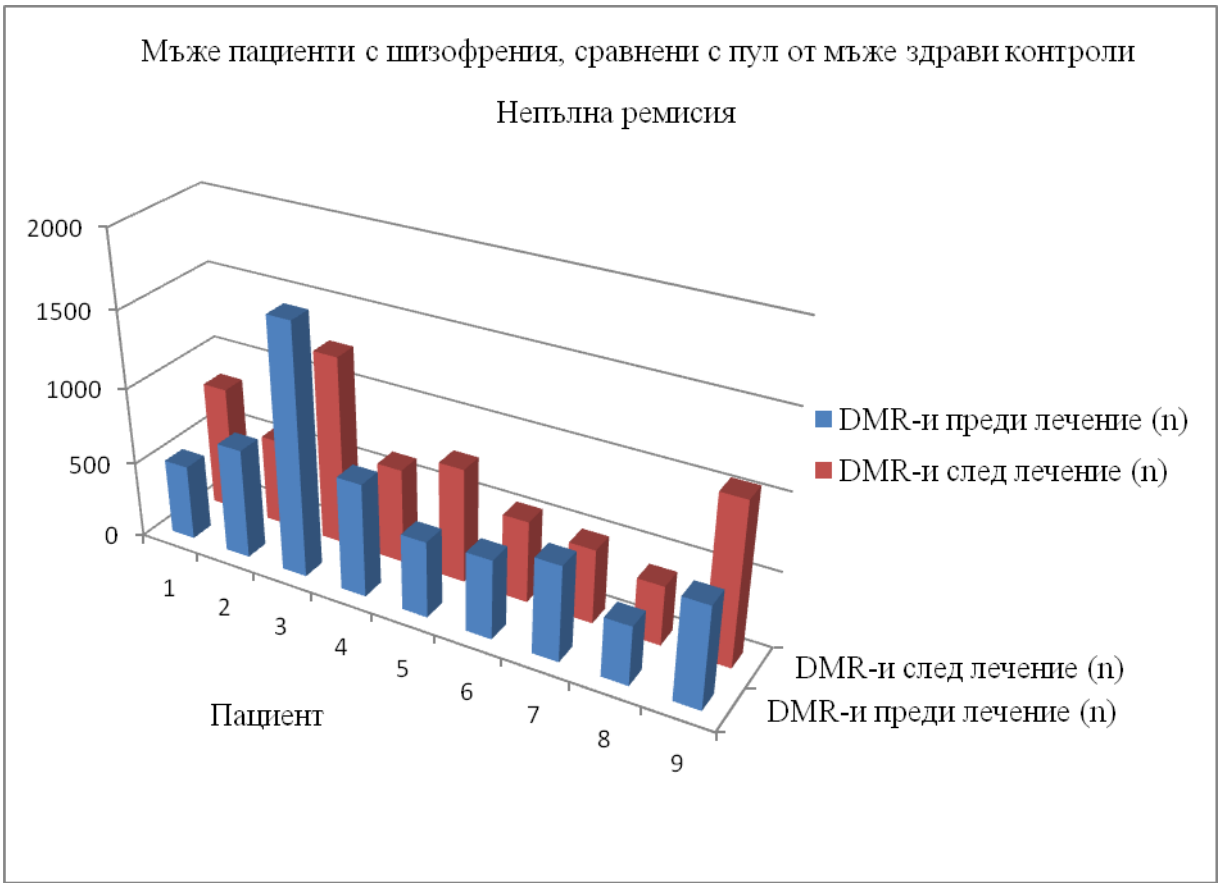
Фигура 38. Брой на DMR-ите при жени с шизофрения в непълна ремисия преди и след лечение.

В групата от пациенти мъже в пълна ремисия, сравнени със здрави контроли са включени трима пациенти. При двама от тях не се наблюдава значителна промяна в броя на DMR-ите при прилагане на антипсихотично лечение. При третия пациент установихме значително увеличаване на броя на DMR-ите след лечение (Фиг. 39).



Фигура 39. Брой на DMR-ите при мъже пациенти с шизофрения в пълна ремисия преди и след лечение.

В групата на пациентите мъже в непълна ремисия участват най-голям брой пациенти – 9. При един от пациентите се наблюдава значително по-голям брой DMR в сравнение с останалите. При трима от пациентите се наблюдава увеличаване на броя на DMR-ите след лечение. Четирима от изследваните пациенти след провеждане на терапия показват по-малък брой DMR-и. Двама от пациентите не показват значителна разлика в броя на DMR-ите в резултат от терапията (Фиг.40).



Фигура 40. Брой на DMR-ите при мъже пациенти с шизофрения в непълна ремисия преди и след лечение.

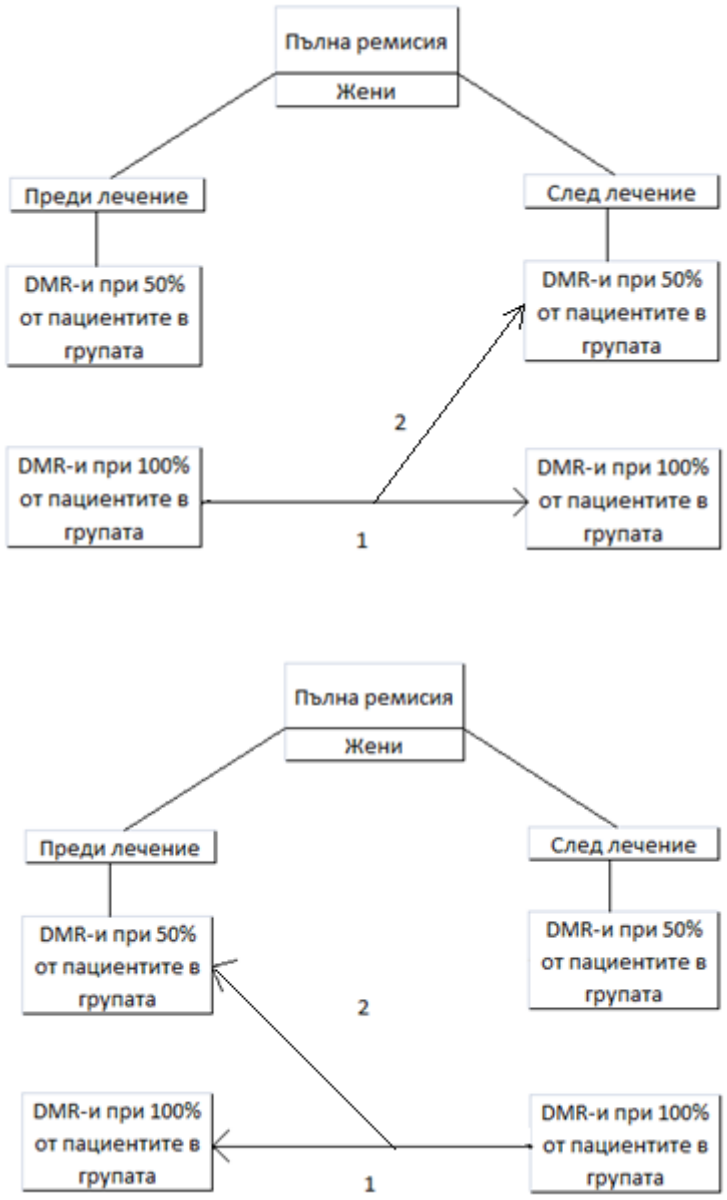
При някои пациенти се наблюдава намаляване на броя на DMR-ите след лечение, докато при други анализът показва точно обратното - увеличаване на броя на DMR-ите. Има трета група от пациенти, при които броят на DMR-ите е почти същият преди и след лечение. От анализа на тези резултати става ясно, че разликите в броя на DMR-ите не корелира с отговора към проведената медикаментозна терапия.

Втората стъпка при анализа на данните е да се сравнят DMR-ите при пациентите във всяка от групите. Критерият, който се използва за подбор на DMR-и със значение за заболяването е съответният DMR да се среща в повече от 50% от пациентите в съответната група. Като DMR-и с най-голямо значение се приемат тези, които се срещат при всички пациенти от съответната група. В този случай те биха могли да се разглеждат като асоциирани в най-висока степен със заболяването (Табл.20).

Таблица 20. Брой на DMR-ите, присъстващи при > 50% или при 100% от пациентите с шизофрения в съответната група, както преди, така и след провеждане на терапия.

	Жени				**Мъже**			
	Пълна ремисия		**Непълна ремисия**		**Пълна ремисия**		**Непълна ремисия**	
	DMR-и преди лечение (n)	**DMR-и след лечение (n)**	**DMR-и преди лечение (n)**	**DMR-и след лечение (n)**	**DMR-и преди лечение (n)**	**DMR-и след лечение (n)**	**DMR-и преди лечение (n)**	**DMR-и след лечение (n)**
> 50% от пациентите	867	785	627	680	306	293	299	291
100%от пациентите	26	16	46	77	56	46	14	11

Последният метилационен анализ, който е проведен, цели да се определят DMR-ите, които се срещат в 100% от пациентите във всяка отделна група (жени/мъже; пълна/непълна ремисия, преди и след лечение). DMR-ите, срещащи се при 100% от пациентите жени с пълна ремисия преди лечение се сравняват първо с DMR-ите, срещащи се при 100% от пациентите жени с пълна ремисия след лечение. DMR-ите, които съвпадат между двете групи се изключват от анализа, тъй като техния метилационен профил не се променя в резултат от лечението. Останалите DMR-и, (срещащи се при 100% от пациентите жени с пълна ремисия преди лечение), се сравняват с DMR-ите, срещащи се при >50% от пациентите жени с пълна ремисия след лечение. Тези гени, които съвпадат отново се изключват от анализа, тъй като приемаме, че нямат отношение към ефекта от лечението (Фиг. 41). Предполагаме, че гените с DMR-и, които се откриват при 100% от пациентите жени с пълна ремисия преди лечение и не се срещат при същите пациенти след терапия имат отношение към лечението на шизофрения и допускаме, че след допълнителни анализи те биха могли да бъдат преценени като потенциални мишени за разработване на нови терапевтични средства.



Фигура 41. Алгоритъм за анализ на резултатите от метилационния микрочипов анализ преди и след лечение.

Същият анализ проведохме и за останалите три групи: мъже в пълна ремисия, жени в непълна ремисия и мъже в непълна ремисия.

Двете групи с непълна ремисия са относително разнородни по отношение на ефекта от лечението, тъй като той се определя субективно на базата на интервю с психиатър. В групата от жени пациенти с шизофрения с непълна ремисия всички DMR-и, които се срещат при всички пациенти преди лечението се откриват след лечение в 50% и повече от пациентите от същата група. При провеждане на анализ за същата

група по отношение на гените с DMR-и след лечение се установява, че само един ген с DMR от общо 77 (*EXOSC6*), който е с променен метилационен профил след лечение не се открива в същата група преди лечение в повече от 50% от пациентите. Всички пациенти в тази група имат хиперметилиран CpG остров (CpG : 124) във вътрешността на гена *EXOSC6*. Точната функция на продукта на този ген все още не е известна, но се предполага, че участва в деградацията на иРНК.

При провеждането на същия анализ в групата на мъжете пациенти с шизофрения с непълна ремисия, не са установени никакви гени с DMR-и, които да отговарят на критериите за значимост, както преди, така и след лечение.

В групата на жени пациенти с шизофрения с пълна ремисия е открит един общ за всички пациенти в групата и специфичен за периода преди лечението ген с DMR от 26 гена - *MIR181C* и 1 от 16 общ за всички пациенти в групата и специфичен за периода след лечението ген с DMR - *BCOR*. Тези гени участват в регулацията на транскрипцията и убиквитинирането. Получените данни не може да се интерпретират по отношение на лечението, защото DMR-ите на тези гени при различните пациенти в групата са с различна локализация и различен метилационен статус (Табл. 21).

Таблица 21. Функция на гените с DMR-и при групата от жени пациенти с шизофрения с пълна ремисия.

Жени с шизофрения с пълна ремисия						
Име на гена	Функция на гена	Цитолента	Хромозома	Описание	CpG	Метилационен статус
Преди лечение						
MIR181C	посттранскрипционна регулация	p13.13	chr19	Промотор	117/41	Хиперметилиран
След лечение						
BCOR	убиквитиниране на протеини или транскрипционен корепресор	p11.4	chrX	Вътрегенно	54/75/168	Хиперметилиран

В групата на мъже пациенти с шизофрения, при които има пълна ремисия, се установяват 9 от 56 гени с DMR-и общи за всички пациенти в групата и специфични за

периода преди лечение (*16orf70, CST3, DDRGK1, FA2H, FLJ30058, MFSD2B, RFX4, UBE2J1, ZNF311*) и 6 от 46 гени с DMR-и общи за всички пациенти в групата и специфични за периода след лечението (*AP1S3, C16orf59, KCNK15, LOC146336, MGC16384, XRN2*). Има вероятност тези гени да бъдат свързани с ефекта от лечението при пациенти с шизофрения от мъжки пол. Таблица 22 представя гените с DMR-и и техните функции при пациентите мъже с пълна ремисия. Някои от тези гени участват в регулацията на транскрипцията, сфинголипидния метаболизъм и разграждането на белтъците. Функцията на някои от гените в тази група все още е неизвестна. Предполага се, че хиперметилирането на генните промотори потиска транскрипцията, докато хипометилирането я активира. Все още метилационният профил на CpG островите извън промоторните райони не може да се тълкува еднозначно. CpG островите на четири от гените с DMR-и открити в периода преди лечение са хиперметилирани (два в промоторната област, един - вътрегенно и един – в далечни регулаторни елементи). Преди лечението четири гени с DMR-и имат вътрегенни хипометилирани CpG острови. След провеждане на лечение при пет от шестте гена, CpG островите са хиперметилирани (два в промотора, два в далечни регулаторни елементи и един вътрегенно) и един ген има вътрегенен хипометилиран CpG остров.

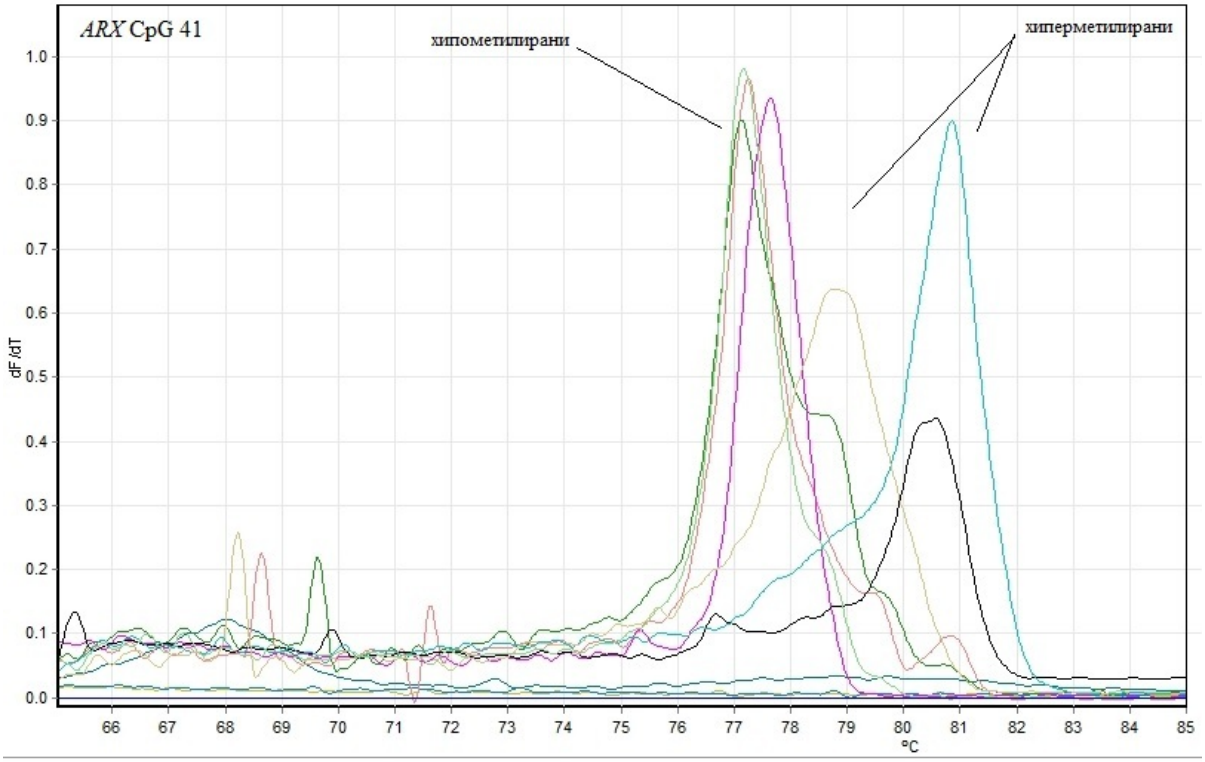
Таблица 22. Функция на гените с DMR-и при групата от мъже пациенти с шизофрения с пълна ремисия преди и след лечение.

Мъже с шизофрения с пълна ремисия						
Име на гена	Функция на гена	Цитолента	Хромозома	Описание	CpG	Метилационен статус
Преди лечение						
C16orf70	неизвестна функция	q22.1	chr16	Промотор	CpG: 44	Хиперметилиран
CST3	инхибитор на цистеиновите протеинази	p11.21	chr20	Вътрегенно	CpG: 84	Хипометилиран
DDRGK1	неизвестна функция	p13	chr20	Вътрегенно	CpG: 47	Хиперметилиран
FA2H	метаболизъм на сфинголипидите	q23.1	chr16	Вътрегенно	CpG: 78	Хипометилиран
FLJ30058	неизвестна функция	q26.1	chrX	Вътрегенно	CpG: 63	Хипометилиран

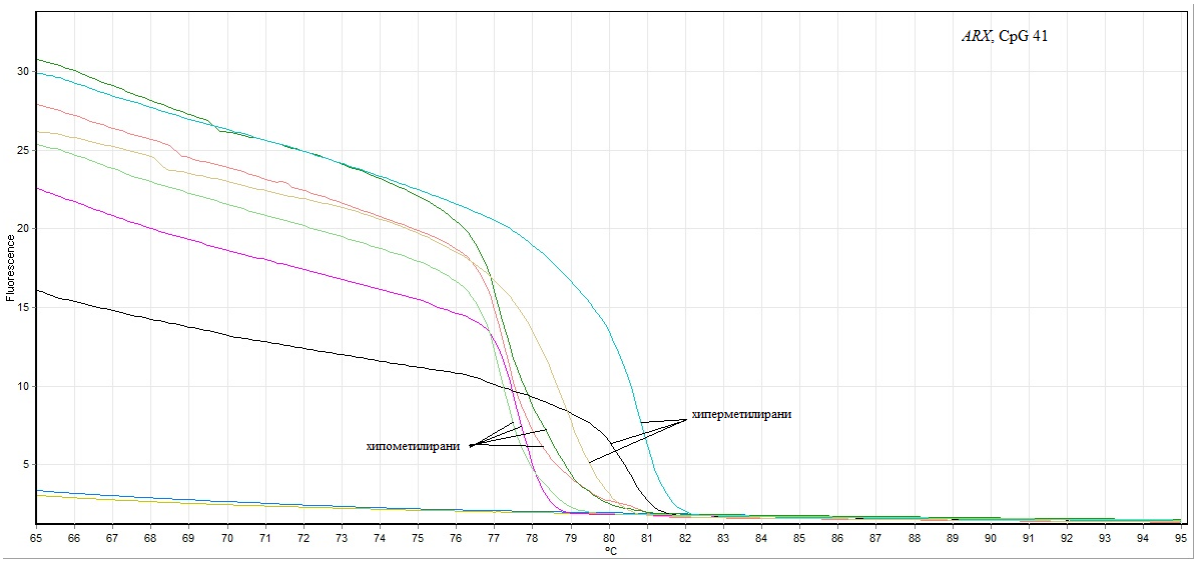
MFSD2B	неизвестна функция	p23.3	chr2	Промотор	CpG: 66	Хипометилиран
RFX4	транскрипционен фактор	q23.3	chr12	Промотор	CpG: 41	Хиперметилиран
UBE2J1	убиквитин-медиирана протеолиза	q15	chr6	Вътрегенно	CpG: 103	Хипометилиран
ZNF311	транскрипционен фактор	p22.1	chr6	Далечни регулаторни елементи	CpG: 42	Хиперметилиран
След лечение						
AP1S3	вътреклетъчен протеинен транспорт	q36.1	chr2	Вътрегенно	CpG: 79	Хиперметилиран
C16orf59	неизвестна функция	p13.3	chr16	Промотор	CpG: 67	Хиперметилиран
KCNK15	протеин от калиевите канали	q13.12	chr20	Промотор	CpG: 70	Хипометилиран
LOC146336	неизвестна функция	p13.3	chr16	Далечни регулаторни елементи	CpG: 22	Хиперметилиран
MGC16384	неизвестна функция	q24.33	chr12	Промотор	CpG: 88	Хиперметилиран
XRN2	метаболизъм на РНК	p11.22	chr20	Далечни регулаторни елементи	CpG: 53	Хиперметилиран

5. Валидиране на метода на метилационен ДНК микрочипов анализ

Изследван е метилационният профил на гените *SOX3* и *ARX* чрез MS-HRM техниката. По отношение на *ARX* гена е изследван CpG остров 41 при пациенти мъже (Фиг. 42 и 43), при които той е хипо- или хиперметилиран. Температурата на топене на метилирания фрагмент и в двата случая е 81°C, докато при неметилирания фрагмент е между 77°C и 78°C. От показаните схеми се вижда значителната разлика в профилите при хипер- и хипометилирани ДНК проби.

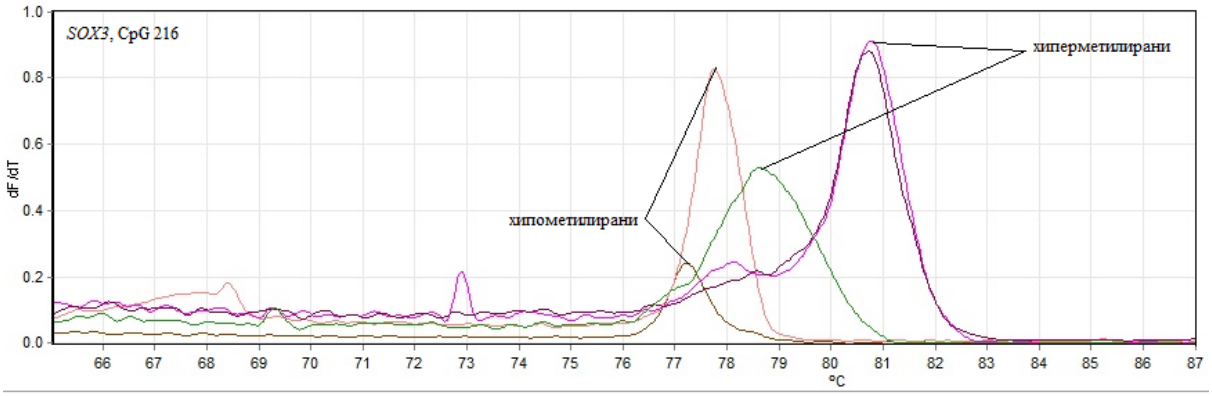


Фигура 42. Метилационен профил на CpG 41 на *ARX* гена.

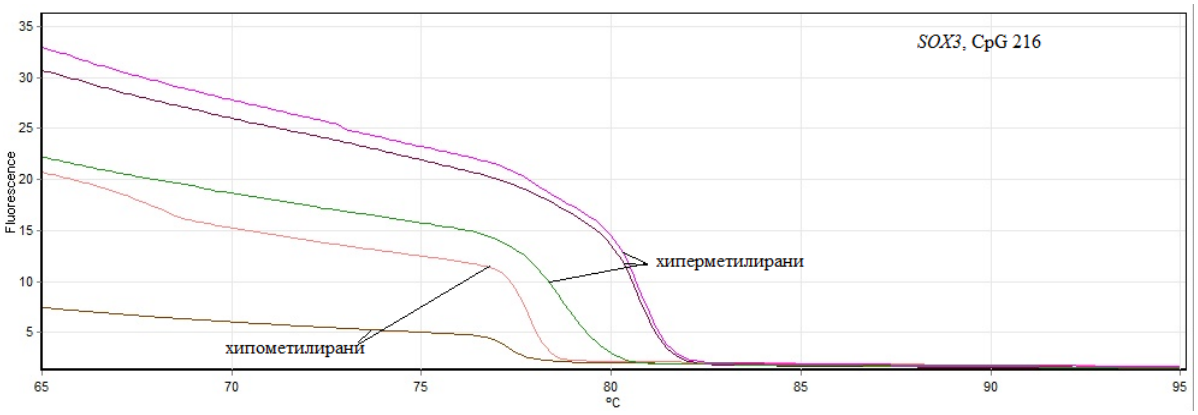


Фигура 43. Разлики в метилационния профил на CpG 41 на *ARX* гена.

CpG 216 на *SOX3* гена е изследван при пациенти жени, при които е хипо- или хиперметилиран за сравнение (Фиг. 44 и 45). Температурите на топене на метилирания и неметилирания фрагмент се различават с приблизително 3˚C (~77,5-80,5˚C), което определя значителната разлика в профилите при хипер- и хипометилирани ДНК проби.



Фигура 44. Метилационен профил на CpG 216 на *SOX3* гена.

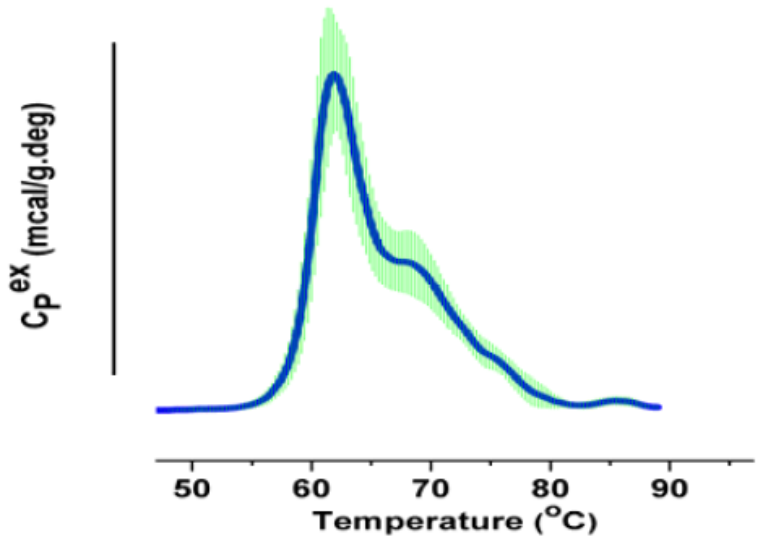


Фигура 45. Разлики в метилационния профил на CpG 216 на *SOX3* гена.

6. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения

6.1. Калориметрични профили на кръвни серуми от пациенти с шизофрения

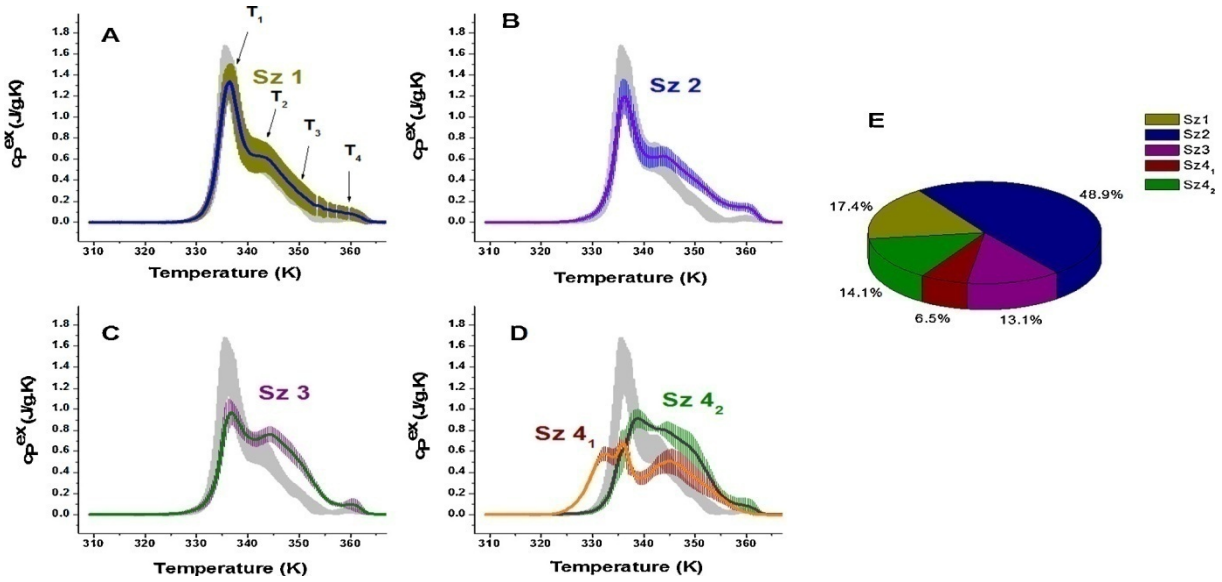
Проведените изследвания на кръвен серум през различни етапи от тяхната медикаментозна терапия чрез метода на диференциална сканираща калориметрия показаха значителни разлики между ДСК термограмите на изследваните пациенти с шизофрения и тези характерни за здрави индивиди.



Фигура 46. Типична усреднена термограма (плътна линия) и стандартно отклонение (щрихована област) на кръвен серум от здрави индивиди (n=18).

Калориметричният профил на кръвен серум от здрави контроли показва четири типични прехода: основен ендотермичен преход T_1 при около 62°C (Фиг. 46), който може да бъде приписан на белтъка с най-голяма концентрация в серума - албумин (60% от общия плазмен белтък). Други белтъци като хаптоглобин, α_1-антитрипсин, Tf, C3 и C4 компоненти на комплемента също могат да допринесат за този преход, макар и в много по-ниска степен. Този основен преход е последван от два прехода/рамена при ~ 68°C (T_2/Igs) и 75°C (T_3/α_2-макроглобулин, церулоплазмин, C3 и C4 компоненти на комплемента), които са свързани с глобулините (~40% от общото съдържание на белтък) и високо-температурен (85°C- T_4, дължащ се на IgG и Tf) и нисък енталпиен преход, който се дължи на серумния трансферин (с концентрация 3% до 4% от общото количество белтък). Усреднението ДСК профил получен за здрави индивиди формира референтна термограма (R термограма)/контрола. (Фиг. 47) [463]. Характерното съотношение на топлинните капацитети на преходите T1 и T2, $c_P^{ex}T1/c_P^{ex}T2$

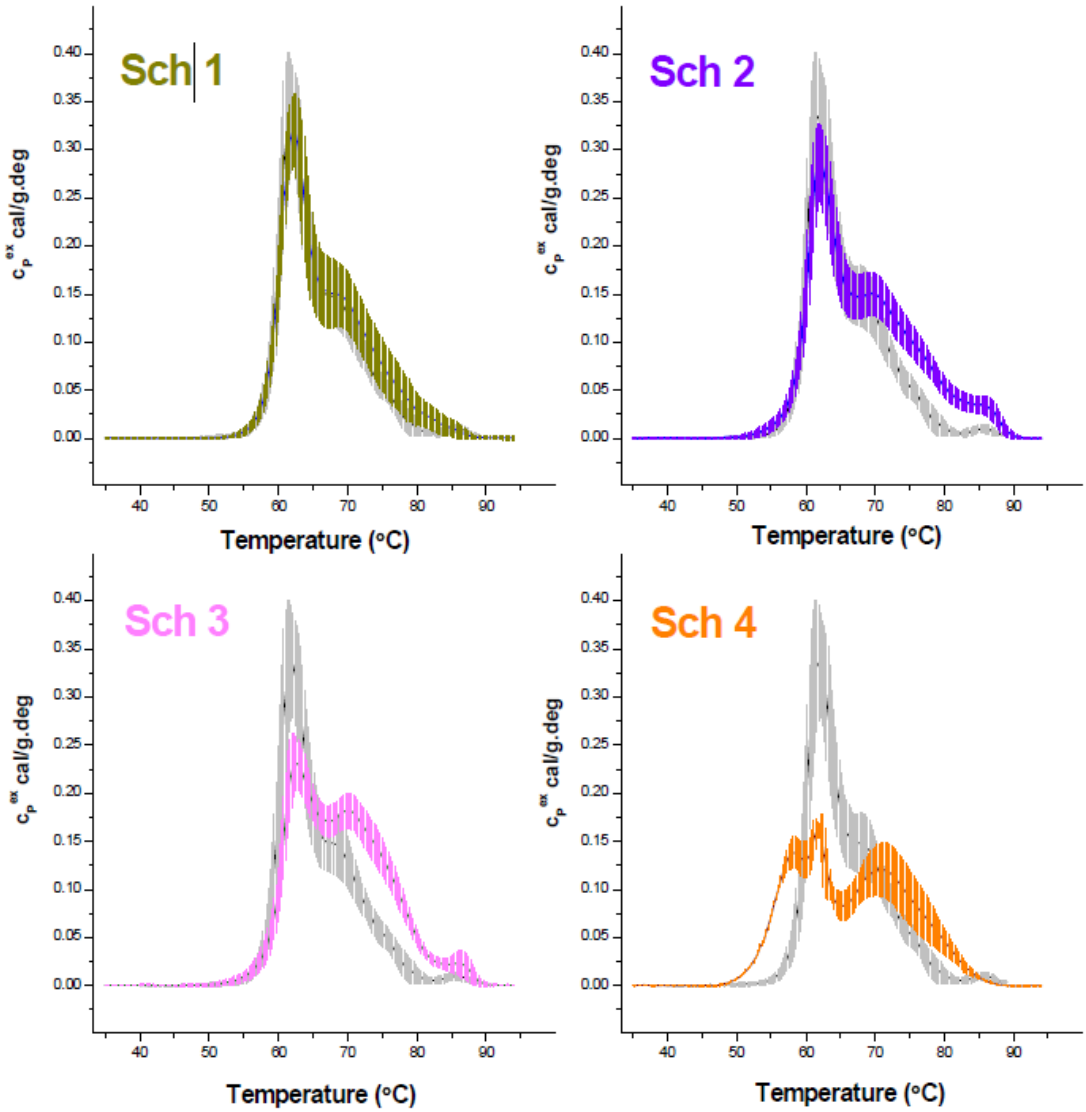
(измерване на съотношението на серумен албумин/глобулини) е 2.56±0.72 за термограмите на здрави индивиди (данни за 21 здрави доброволци).



Фигура 47. Калориметрични профили на кръвен серум от пациенти с шизофрения. ДСК термограмите, усреднени криви (плътни линии) и стандартно отклонение (защриховани), са класифицирани в четири групи, означени Sz1-Sz4 (две подгрупи Sz41 и Sz42). Броят (n) на термограми, усреднен в различните групи, са: n = 16 за Sz1 (A, синя линия, тъмножълта защрихована), n = 45 за Sz2 (B, виолетова линия, синя защрихована), n = 12 за Sz3 (C, зелена линия, лилава защрихована) и n = 19 за Sz4 (D, Sz41 , червена линия, зелена защрихована, n = 6; Sz42, оранжева линия, червена защрихована, n = 13). Във всеки панел групите Sz се сравняват с типичния калориметричен профил на здрави индивиди (черна пунктирана линия, светло сива защрихована, n = 21). Кръгова диаграма, показваща броя на случаи с шизофрения във всяка калориметрична група като процент от общия брой на случаи с шизофрения (E).

Докато термодинамичното поведение на серум от здрави индивиди се характеризира с един типичен профил, то за серумите от изследваните пациенти с шизофрения няма само един характерен ДСК профил, а може да се опише с 4 типа характеристични термограми, означени с Sch1 - Sch4 (Фиг. 47). Те дефинират 4 групи от ДСК профили, описващи термодинамичното поведение на изследваните до момента случаи на болни от шизофрения. Усреднените ДСК профили за групите Sch1 - Sch4 и отклонението от усреднените профили са представени на фиг. 48, а за сравнение на всеки панел е показана и типичната ДСК крива за здрави индивиди. Измерени са ДСК

профили на серум от 92 пациента. При термограмите на пациентите с шизофрения се наблюдават само три прехода - T1, T2 и T4. (Фиг. 47).



Фигура 48. Усреднени калориметрични профили (плътни линии) на пациенти с шизофрения, класифицирани в 4 характеристични групи, означени Sch1 - Sch4. Броят термограми (n), които са усреднени за отделните групи са съответно: n=16 за Sch1, n=45 за Sch2, n=12 за Sch3 и n=6 за Sch4. Стандартното отклонение е представено с щрихована област за всяка група. На всеки панел за сравнение е представена типичната термограма за здрави индивиди.

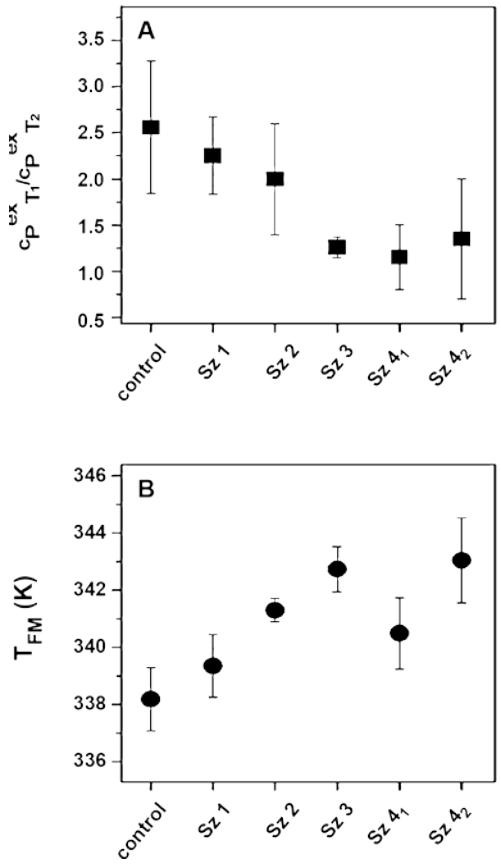
В 79% от случаите техните температури на преход съвпадат с T_1, T_2 и T_4 в контролната група, докато в останалата част от термограмите те значително се отклоняват от тези, намерени при здрави индивиди. Във всички групи от пациенти много трудно се открива прехода T_3. ДСК профилите на пациентите с шизофрения се разделят в четири групи на базата на отношението $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ (фиг. 49 А):

- Sz1, $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ =2.25±0.42, подобни на контролната група;
- Sz2, $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ =2.00±0.60, леко отклоняващи се от контролната група;
- Sz3, $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ =1.26±0.11, силно отклоняващи се от контролната група;
- Sz4 е разделена на две подгрупи (те имат сходни $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$, но се различават по максимумите на температурите на съответните преходи):
    a. Sz41, $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ =1.15±0.35;
    b. Sz42,, $c_P^{ex_{T_1}} / c_P^{ex_{T_2}}$ =1.35±0.65

Средните ДСК профили за четирите групи са представени на фиг. 47 А–Д като на всяка фигура е показана и характерната за здрави индивиди термограма.

При групите Sch1, Sch2 и Sch3 ДСК термограмите се характеризират с три последователни прехода. Общите характеристики включват понижен T_1 и повишен T_4 преходи в сравнение с контролите. Последният високо температурен преход при Sch2 и Sch3 групите има по-висока енталпия в сравнение с тази на контролата, което най-вероятно е свързано с повишена концентрация на трансферин. Най-драстична разлика между Sch-групите и контролните термограми се наблюдава при групата Sch4. (Фиг. 47D). Характерно за тази група е разцепването на първия преход на два прехода. Докато при Sch1 - Sch3 топлинният капацитет на първия преход при 62^{o}C, cPexT1, има по-висока стойност от тези на следващите преходи, при Sch4, cPexT1 е силно редуцирана и съизмерима с cPex на следващите два прехода. Групата Sch4 е уникална поради присъствието и на допълнителен преход 332 K за подгрупа Sz41 и 339 K за подгрупа Sz42. Прехода 359 K липсва само при подгрупа Sz41.

Промените в термодинамичните параметри, съотношението сеРхТ1 /сРехТ2 и TFM, в групите са представени на Фиг. 49.



Фигура 49. Термодинамични параметри на калориметричните групи. Съотношение на преходите на топлинните капацитети на албумин и имуноглобулини, сехТР1/сРехТ2 (А) и температурата на първия момент, TFM (В).

Наблюдава се прогресивно намаляване на отношението сРехТ1 /сРехТ2 от първа към четвърта група. TFM са по-високи при всички групи от пациенти в сравнение с контролната термограма. (Фиг. 49). Статистическата оценка показва, че групи Sz2–Sz4 силно се различават от контролите, докато Sz1 е по-близо до контролната група (статистическите параметри са показани в Табл. 23).

Таблица 23. Термодинамични параметри (средни стойности и стандартно отклонение) пресметнати от калориметричните профили на кръвен серум от здрави индивиди и пациенти с шизофрения: отношение на топлинните капацитети,

съответстващи на преходите T1 и T2 при 62˚C и 69˚C (cPexT1/ cPexT2), енталпията (ΔHcal) и температурата на първия момент (TFM).

Група	Брой пациенти	cPexT1/cPexT2	ΔHcal (cal/g. deg)	TFM (°C)
Здрави индивиди	21	2.56 ± 0.72	3.13 ± 0.34	64.03 ± 1.1
Sch1	16	2.25 ± 0.42	3.22 ± 0.38	65.20 ± 1.1
Sch2	45	2.00 ± 0.60	3.48 ± 0.60	67.15 ± 0.42
Sch3	12	1.26 ± 0.11	3.65 ± 0.45	68.59 ± 0.8
Sch41	6	1.15 ± 0.35	3.15 ± 0.97	66.34 ± 1.25
Sch42	13	1.35 ± 0.65	3.53 ± 0.80	68.9 ± 1.49

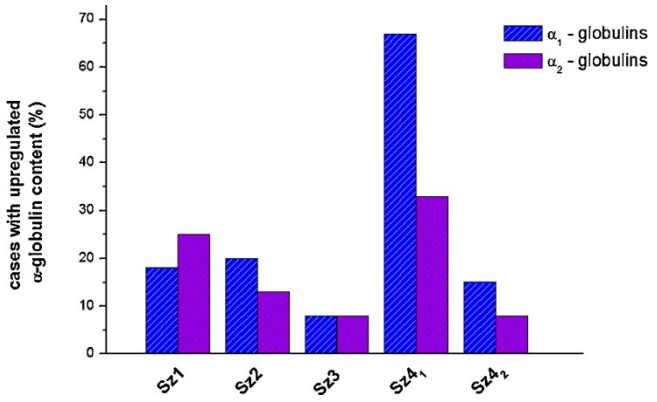
Отношението cPexT1/cPexT2 има по-ниска стойност за Sch1-4 групите, докато енталпията ΔHcal на процеса не се различава съществено в сравнение със стойностите за здрави индивиди (Таблица 23). Температурата на първия момент TFM е с няколко градуса по-висока за Sch1-4 групите от тази за контролните термограми, което означава стабилизиране на плазмения протеом при пациентите, дължащо се вероятно на свързване на биомаркери към някои от плазмените белтъци.

6.2.Определяне на концентрацията на серумните белтъци чрез капилярна електрофореза

С цел да се изследва взаимовръзката между наблюдаваните изменения в калориметричните профили и промяната в концентрациите на някои от най-разпространените серумните белтъци в шизофренния протеом проведохме SPE (капилярна електрофореза на серумни белтъци).

Измерванията на концентрацията на белтъците албумин, α1- и α2-, β1- и β2-глобулините в серума с помощта на капилярна електрофореза показват повишени нива за α1 и α2 при всички Sch групи. (Фиг. 50). Нивото на α1-белтъка е по-високо от нормата за 18% от случаите от група Sch1, 20% за група Sch2, 8% за Sch3, 67% Sch41 и

15% Sch42. Повишено ниво се наблюдава и за α2-белтъка, което е съответно 25% за група Sch1, 13% за група Sch2, 8% за Sch3, 33% Sch41 и 8% Sch42. Нивата на β1 и β2 са завишени в по-малък процент, а в някои случаи са под нормата, в сравнение с тези на α1- и α2-белтъците.



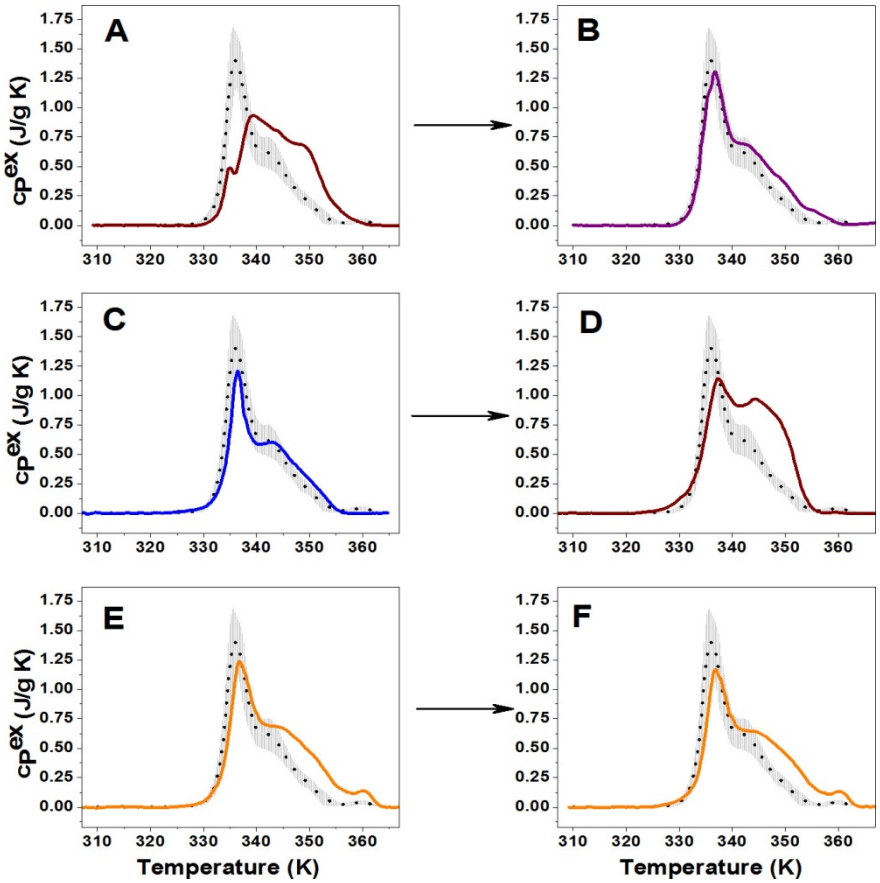
Фигура 50. Случаи с по-високи серумни нива на фракциите на α1- и α2-глобулините от горната граница типична за здрави хора. Данните са представени като процент от общия брой на случаи в рамките на всяка от Sz1-4 групите. Концентрациите на α1- и α2-глобулините бяха определени чрез електрофореза на серумни белтъци.

6.3.Проследяване на протеомните промени с ДСК при пациенти с шизофрения

Проведени са ДСК измервания в различни периоди след началото на лечението за 23 пациента (t1, t2). За 43% от тези случаи ДСК профилът се запазва непроменен, следователно се запазва термодинамичната група в която попадат пациентите. За 38% от разглежданите случаи в резултат на прилаганото лечение се променя групата, в която попадат пациентите, от такава която е била по-драстично модифицирана в сравнение със здрави лица в група по-близка до тази за здрави индивиди (например – от Sch4 в Sch3 и дори от Sch4 в Sch1, която е най-близка до контролата) (Фиг. 51).

В хода на лечението, 50% от термограмите, които силно се различават от контролната група на етап t1 се възстановяват (положителна калориметрична промяна) и 15% от тях почти се припокриват с термограмата на здрави индивиди в етап t2 (Фиг. 51 А и В). Обратна тенденция е установена (отрицателна калориметричната промяна) за 20% от изследваните пациенти - при t2 термограмата се отклонява по-силно от профила при здрави, отколкото в t1 (термограми от Sz1 при t1 преминават или в Sz2, Sz3 или Sz4

в t2 или тези от Sz2 група в t1 превключва към Sz4 група в t2) (Фиг. 51 C и D). 30% от случаите с шизофрения запазват ДСК профила си непроменен и следователно тези случаи остават в една и съща термодинамична група по време на терапия (Фиг. 51 E и F).



Фигура 51. Калориметрично проследяване на пациенти с шизофрения, подложени на антипсихотично лечение. Примери за положителен (A и B) и негативен преход (C и D) (плътната линия) в сравнение със здрави контроли (черната прекъсната линия и светло-сивата защрихована). На фигури E и F са представени термограми, при които няма ефект (плътната линия).

Тези резултати показват, че би могло да се следи ефектът на прилаганото лечение чрез измерване на ДСК профилите на кръвен серум.

VI. Обсъждане

Нашият екип е положил значителни усилия за идентифицирането на генетичните аспекти при шизофрения сред българската популация, за да разшири познанията за етиологията и патогенезата на болестта [227, 497-502]. В настоящия дисертационен труд чрез прилагането на набор от техники са определени метилационният профил и протеомните промени в кръвни проби от пациенти с шизофрения. Изследвани са разликите в профилите преди и след лечение. Това е първото по рода си изследване, проведено върху подбрана група от български пациенти. И в световен мащаб тези изследвания все още са в начален етап особено по отношение на шизофренията. До момента в литературата са докладвани много малко цялостни геномни метилационни изследвания [503, 504].

1. Обсъждане на резултатите от цялолостния геномен метилационен анализ на кандидат-гени за шизофрения

Първият етап на представената научна разработка представя цялостно метилационно изследване, разкриващо разликите в метилационния профил между пациенти с шизофрения и здрави контроли както и полово-специфичните нарушения в метилирането.

За момента все още цялостните метилационни изследвания са малко и в световен мащаб. Не е възможно сравняването на данните с други изследвания тъй като са използвани различни платформи и различни техники с много голяма разлика в резолюцията [476, 481, 505, 506]. Метилационният микрочипов анализ все още е нов и методите за анализ са в процес на развитие. За момента по литературни данни се приема, че статистическият анализ по отношение на имунопреципитирана ДНК за метилационен микрочипов анализ е най-добре да се проведе с помощта на BATMAN критерия [476]. Броят на изследваните в литературата проби, както и тъканите, от които са изолирани се различават значително. Голяма част от изследванията са провеждани в проби от различни части на мозъка, но бройката на изследваните пациенти е относително малка [438]. Едно от най-големите предизвикателства в изследването на епигенетичните промени при невро-психиатричните заболявания е събирането на проби от първичната прицелна тъкан, т.е. мозъка. Тъй като не е възможно да се извършват in vivo епигенетични изследвания в мозъка, се провеждат само

ретроспективни проучвания с постмортем мозъчни проби. Тези експерименти са ограничени от достъп до висококачествени, добре фенотипизирани проби. Има редица потенциални объркващи фактори, които могат да повлияят епигенетичния анализ на тези проби, включително време до аутопсията, време на съхранение, pH, и клетъчна хетерогенност [507]. Ограниченият брой на мозъчни проби, които могат да се изследват затруднява откриването и валидирането на значими асоциации. В повечето случаи използваният биологичен материал е взета постмортем мозъчна тъкан или цереброспинална течност от пациенти и контроли. Причината за избора на тези видове материал е, че шизофренията е заболяване, засягащо мозъка, а най-логично е промени в експресията да се търсят именно в засегнатата тъкан. Подобен подход наистина би имал голяма стойност при идентифицирането на етиологичните фактори в развитието на болестта, които за съжаление все още не са напълно изяснени.

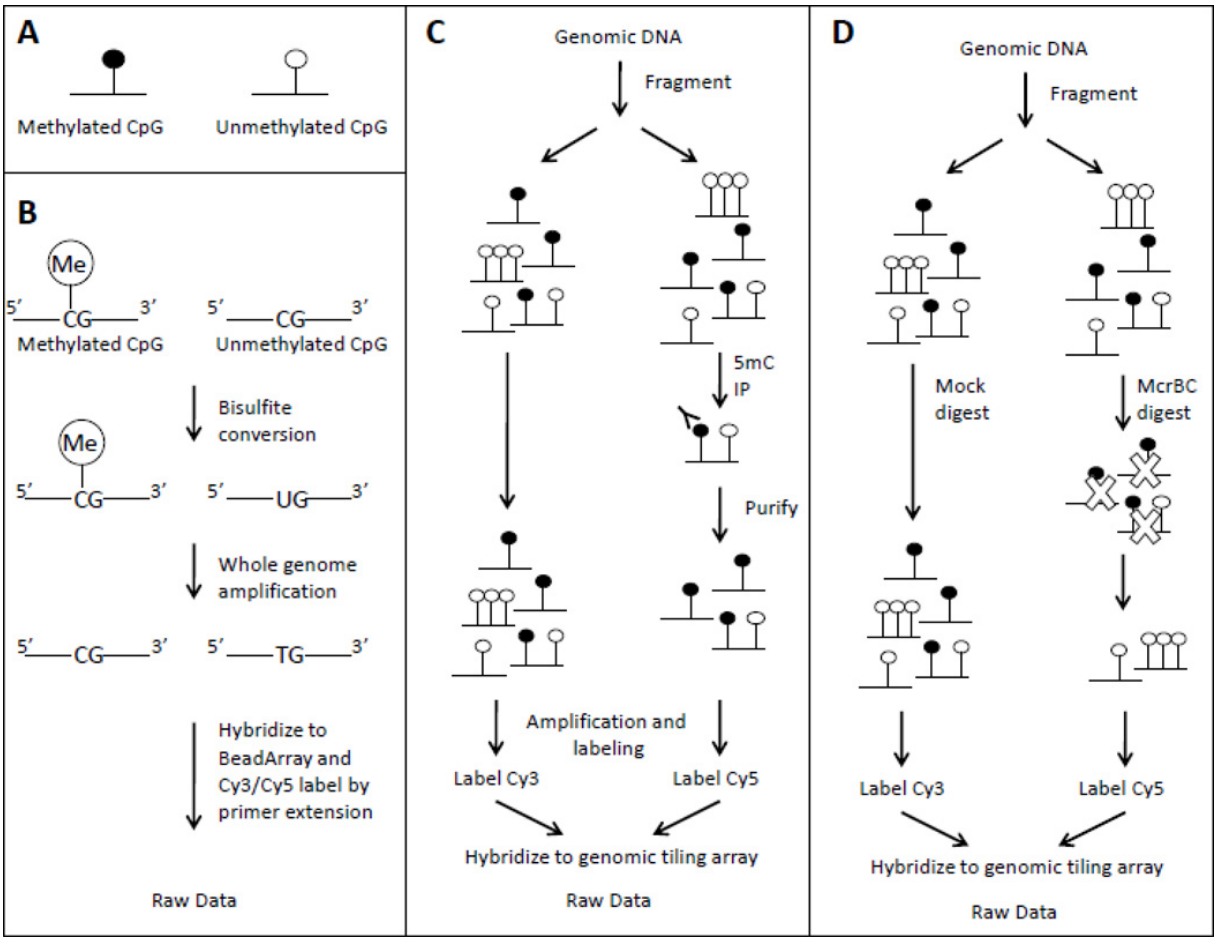
От друга страна търсенето на биомаркери с цел профилактика, диагностика и прогноза на шизофренията в клиничната практика прави посочените биоматериали не особено подходящи за целта. Немислима е мозъчната биопсия на здрав индивид само с цел установяване на риска от развитие на психиатрично заболяване. Пункцията с цел взимане на цереброспинална течност също е сравнително рискована манипулация, с потенциално сериозни странични ефекти.

В последните години редица автори съобщават за изследвания на метилационния профил за търсене на биомаркери в кръв от пациенти с шизофрения с обещаващи резултати [439, 508-512]. Като биологичен материал кръвта е най-лесно достъпна и най-често използвана в био-медицинските проучвания. Материалът може да се взима многократно, в различни стадии на дадено заболяване и по време на различни курсове на терапия, с минимален дискомфорт и риск от странични ефекти при пациента.

Ключов въпрос в епигенетичната епидемиология, особено по отношение на изучаването на интериндивидуалните фенотипни вариации при невро-психиатричните заболявания е възможността да се използват лесно достъпни периферни тъкани, като например кръв [513]. Проведено е изследване за характеризиране на метилома, при което са изследвани мозъчна тъкан и кръв от едни и същи пациенти [514]. Идентифицирани са различни тъканно-специфични модели на ДНК метилиране. Вариациите между тъканите значително надвишават различията в рамките на една

тъкан между отделните индивиди. Интересното е, че някои от вариациите между индивидите показват значителна корелация между кръв и мозъчна тъкан, което показва, че периферните източници на ДНК могат да бъдат полезни в епидемиологични проучвания на сложни невробиологични фенотипове. Няколко проучвания успешно са използвали периферните проби за определяне на значимите епигенетични вариации в кръвта, асоциирани с болестта, въпреки че резултатите трябва да се потвърдят в съответните области на мозъка.

При сравняването на метилационните профили при пациенти и контроли с Agilent метилационни микрочипове са установени 394 DMR-а. В други изследвания тази бройка може да варира значително в рамките на няколко хиляди [506, 515] [516].



Фигура 52. Три основни подхода при ДНК метилационен микрочипов анализ. А) Черните кръгове показват метилирани CpG острови, а белите – неметилирани CpG острови. В) Подход на Illumina за бисулфитно третиране, С) Афинитетно набогатяване

чрез имунопреципитация с метилцитозин (IP) D) Метилационно-чувствителен рестикционен анализ.

Базираните на MeDIP микрочипов анализ методи в момента са най-подходящият инструмент за цялостни геномни метилационни изследвания. За сравнение другите налични и широко застъпени техники са по-евтини, но за сметка на по-ниската точност, по-ниската чувствителност и множество други ограничения.

За провеждането на метилационен микрочипов анализ има три основни подхода за третиране на ДНК [517]: бисулфитно третиране [518], афинитетно набогатяване (например MeDIP [465] и MBDCap [519], както и рестрикционен анализ (например HELP [520] и CHARM [521] (Фиг. 52).

Повечето от диференциално метилираните гени в настоящото изследване, открити при анализа на общия пул от пациенти, играят важна роля в синаптичната трансмисия и развитието на нервната система. По отношение на *HRH1* и *FGFR1* гените има данни за участието им при развитието на шизофрения, докато останалите са нови кандидат гени [522-525].

MYLIP, *CRMP1* и *FGFR1* играят важна роля в развитието на нервната система [526-531]. *MYLIP* е E3 убиквитин-протеин лигаза, която медиира убиквитинилирането и последващата протеомна деградация на миозиновата регулаторна лека верига (MRLC), LDLR, VLDLR и LRP8. Активността й зависи от ензимите E2 от UBE2D семейството. Протеазомната деградация на MRLC инхибира растежа на дендритите и аксона в присъствието на NGF, като противодейства на стабилизирането на MRLC от saposin-подобен протеин (CNPY2/MSAP) и намалява CNPY2-стимулирания растеж на невроналните израстъци. Действа като стерол-зависим инхибитор на холестероловия клирънс от клетките чрез медииране на убиквитинирането и последващо деградране на LDLR [527, 529].

CRMP1 кодира член от семейството на цитозолните фосфопротеини, експресиращи се в значителна степен в нервната система. Кодираният протеин е част от семафориновия-3а-зависим сигнален път в невроните на развиващия се мозък [532] и участва във reelin-зависимата радиална невронална миграция [531]. Играе роля в насочването на аксоните, растежа и клетъчната миграция. *CRMP1* посредничи в *reelin*

сигнализацията при кортикалната невроналната миграция. [531] *CRMP1* дефицитни мишки показват нарушено дългосрочно потенциииране и нарушения в заучаването и паметта [533, 534]. При такива мишки се наблюдават поведенчески аномалии, наподобяващи тези при шизофрения. *CRMP1* хетеромеризира с *CRMP2*, кодиран от ген, за който е известна връзка с шизофрения и други мозъчни заболявания чрез регулиране на глутаматната сигнализация посредством комплекса WAVE1/Rac1 [535]. *CRMP1* има роля в поддържане на цитоскелета чрез стабилизиране на свързването на микротубулите [536] и участва в F-актиновата полимеризация [537] - процес критично регулиран по време на формирането и поддръжката на синапсите или невроналната миграция. *CRMP1lv* се регулира от cdc42 [538] - протеин, активиран от *reelin* [539] и *NDEL1*, който е важен участник в *DISC1* пътя [540]. По този начин, *CRMP1* се намира в пресечната точка на двата *DISC1* и *reelin* пътя, осигурявайки допълнителни доказателства за конвергенцията на асоциираните с шизофрения пътища [541-543]. *CRMP1* има отношение към анхедонията. При изследване на лимфобластни клетъчни линии от пациенти с шизофрения е установена по-високата му експресия [526]. Полученият резултат в нашето изследване, показващ хипометилиран CpG остров в промотора на този ген, може да се приеме за потенциален механизъм на дерегулация на експресията на *CRMP1*.

Протеинът кодиран от *FGFR1* гена е тирозин киназа от семейството на рецепторите на фибробластните растежни фактори, чиито лиганди са специфични членове на семейството на фибробластните растежни фактори [544].

FGFR1 играе съществена роля в регулирането на ембриоланото развитие, клетъчната пролиферация, диференциация и миграция. *FGFR1* е широко разпространен в нервната система и е необходим за растежа на хипокампуса и пролиферацията на невроналните стволови клетки [545].

NXPH3 е специфичен лиганд на синаптичния α-неурексин, който функционира в централната нервна система като адхезионна молекула и е от значение за освобождаването на невротрансмитерите [546].

HMOX1 кодира хем оксигеназа 1. Тя участва в катаболизма на хем. В резултат се получава въглероден оксид, който има отношение към невротрансмисията. Установен е и противовъзпалителният й ефект чрез повишаване на експресията на антагонистите на

IL-10 и IL-1R [547], като това подкрепя една от основните хипотези за развитието на шизофрения - имунологичната [548].

GABRA2, LIN7B гените са свързани с невротрансмисията. *GABRA2* (рецептор на гама-аминомаслената киселина субединица алфа-2) е член на семейството на лиганд-зависимите йонни канали и е отговорен за инхибиторния ефект на ГАМК [549]. ГАМК е основният инхибиторен невротрансмитер в мозъка при гръбначни и осъществява навронално инхибиране чрез свързване към ГАМК/бензодиазепинов рецептор и отваряне на хлоридни канали. *GABRA2* се асоциира с развитието на алкохолна зависимост , докато данните за ефекта му при шизофрения са оскъдни [550].

LIN7B играе роля в установяването и поддържането на асиметрично разпределение на каналите и рецепторите по повърхността на поляризираните клетки. Има отношение към екзоцитозата на синаптичните везикули и клетъчната адхезия в мозък [551].

2. Обсъждане на разликите в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола

Известно е, че ДНК метилирането също е полово-специфично [494, 552]. При сравнение на DMR-ите между общия пул от пациенти с шизофрения и пула от мъже пациенти са намерени три общи гена: *GABRA2, LIN7B, CASP3*, докато при сравнението на DMR-ите между общия пул и пула от жени пациенти е установена разлика само при *CASP3*. CpG островът на *MACF1* гена е изключен от последващ анализ тъй като метилационният му статус не съвпада между двата изследвани пула. Така тези DMR-и биха могли да се разглеждат като потенциални кандидат гени и биомаркери, които имат отношение към развитието на заболяването. Разликите между DMR-ите на 10-те най-добри кандидат гени между трите пула може да се обясни с голямата хетерогенност на заболяването, както и присъщите на половете разлики в метилационния статус [10, 553-555].

CASP3 генът е общ измежду най-вероятните 10 гени на трите изследвани пула и може да се приеме като най-силен кандидат. *CASP3* участва в клетъчната апоптоза. CpG островът на този ген е хиперметилиран и е разположен вътрегенно. По тази причина се предполага, че той е свръхактивиран. Все повече доказателства сочат, че мозъчни

клетки в кората при пациенти с шизофрения са податливи в по - висока степен на апоптоза. Апоптозата е важен механизъм за моделиране на организма по време на развитието, активен още от началото на вътреутробното развитие и има данни, че той може да участва в патогенезата на шизофренията [556]. Така че нашите резултати подкрепят апоптичния механизъм в патофизиологията на шизофрения [557-559]. *CASP3* участва в регулацията на серотониновата и глутаматната невротрансмисия [560, 561]. Този ген е от значение и за нормалното ембрионално развитие на мозъка [562].

За намирането на специфичните полови различия са сравнени най-добрите 10 кандидат гени с DMR-и в специфичните по пол пулове и съответните индивидуални проби. Всеки от топ 10 гените с диференциално метилирани CpG острови в двата пула са диференциално метилирани в поне един от индивидуалните пациенти. Като най-убедителни кандидати се приемат тези, намерени в половината или повече от половината от индивидуалните пациенти.

Топ 10 кандидат гените от пула жени участват в апоптозата, синаптичната трансмисия, невроналното развитие, развитието и насочването на аксоните. Четири от тях показват едни и същи DMR-и в повече от половината от индивидуално изследваните пациенти жени: *XIAP, GABDR, OXT и KRT7*.

Изследваният CpG остров в промоторната област на *XIAP* гена е хиперметилиран и може би това води до потискане на неговата експресия. Инактивиране на *XIAP* гена активира *CASP3* и апоптозата [563]. В множество изследвания е предположена известна връзка на *GABRD* гена с шизофрения [496]. Открихме хиперметилиране на CpG остров в промоторния му регион, който е възможен механизъм, обясняващ участието на *GABRD* инактивирането в патогенезата на заболяването. Изследваният CpG остров на *OXT* гена е разположен вътрегенно и е хиперметилиран. Литературни данни показват значително увеличена иРНК при пациенти с депресия [564]. Предполагаме, че хиперметилиране на *OXT* активира гена и може да играе роля при шизофренията. Трудно е да се интерпретира връзката между експресията на KRT7 и хиперметилирането, тъй като данните в литературата са недостатъчни.

Четири от топ 10 гените с DMR-и от мъжкия пул с пациенти са диференцирано метилирани в над 50% от индивидуалните пациенти от мъжки пол: *DHX37, MAP2K2,*

FNDC4 и *GIPC1*, затова те се приемат като най-вероятни кандидат гени. Техните CpG острови с DMR-и са хипометилирани при пациентите.

Техният метилационен статус е трудно да се интерпретира. Функцията на *FNDC4* все още не е известна. *MAP2K2* принадлежи към семейството на MAP киназите. Той активира MAPK1/ERK2 и MAPK2/ERK3, които са свързани със синаптичната пластичност, преживяемостта на клетките, ученето и паметта [565]. DHX37 показва хеликазна активност [566]. GIPC1 генът участва в BDNF-медиираната невротрансмисия и растежа и развитието на невронните израстъци [567, 568]. До момента в литературата няма данни за ролята на тези четири гена при шизофрения. Предполагаме, че те са нови кандидат гени, имащи отношение към развитието на шизофрения при мъже поради различните им профили на метилиране.

3. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения

Вторият етап от изследването е свързано с анализ метилационните профили на пациенти с шизофрения преди и след лечение. Поради влиянието на пола върху метилационния статус пациентите и контролите са групирани в зависимост от пола и отговора към лечение. Диагнозата е много субективна, тъй като се основава само на интервю с пациента. Резултатите от интервюто могат да бъдат нееднозначно интерпретирани, което затруднява анализа на получените метилационни профили.

Епигенетичните характеристики могат да бъдат модулирани през целия живот: от ембрионалната фаза до зрелостта. Епигенетичното ремоделиране се влияе от фактори на околната среда като храненето, наркотици, лекарства, физически и психо-социални фактори [569]. Епигенетичните промени са обратими и податливи на влиянието на околната среда, така че те могат да бъдат много подходяща мишена за откриването на нови потенциални стратегии за лечение.

Все още ефектът от антипсихотичните лекарства върху епигенетичните модификации не е напълно изяснен. Едно проучване върху цялостното ДНК метилиране в левкоцитите на пациенти с шизофрения открива значително глобално хипометилиране, докато лечението с халоперидол по литературни данни води до увеличаване на метилирането [510].

Установено е, че много от антипсихотиците може да доведат до епигенетични модификации. Валпроевата киселина инхибира хистоновите деацетилази и води до ДНК деметилиране. Халоперидолът също води до хистонови промени и глобално ДНК деметилиране при мозък на женски плъх, въпреки че има доказателства, че лечението с халоперидол няма отношение към метилационния профил на *reelin* и *GAD67* гените в фронталния кортекс или стриатума [570, 571]. Лечението с клозапин увеличава H3K4 триметилирането на *GAD67* гена в префронталната мозъчна хора при хора. Клозапинът намалява метионин-индуцираното хиперметилиране на промотора на *reelin* и увеличава хистоновото ацетилиране. Също така тя индуцира хиперацетилиране [572, 573]. Във фронталния кортекс и стриатума на мишки след лечение със сулпирид и амисулпирид се наблюдава повишено хистоново ацетилиране и понижено ниво на метилиране в промотора на *reelin* гена [573]. Рисперидонът поддържа цялостното H3 фосфо-ацетилиране в стриатума [574]. Налице са данни, които предполагат участието на клозапин, кветиапин и оланзапин в модификациите на хистоните и понижаването на ДНК метилирането в ГАМК-ергичните или глутаматергичните неврони.

Други проучвания представят доста противоречиви резултати за лечението с халоперидол и неговите ефекти върху епигенетичните профили. Някои експерименти показват, че той не повлиява хистоновите модификации и ДНК метилирането и няма доказателства за промяна в модела на хистоново ацетилиране в стриатопалидалните неврони, докато се установява увеличение на хистоновото фосфорилиране [573, 575].

Метилационният статус на 20 пациенти с шизофрения (8 жени и 12 мъже) е анализиран върху 40 микрочипа като пробите преди и след лечение от един пациент са върху отделни стъкла. Според нашите критерии за анализ на данни от метилационния микрочипов анализ сравнихме броя на DMR-ите преди и след лечението на един и същ пациент със здрави контроли от съответния пол. Пациентите са разделени в четири групи според пола и ефекта от терапията.

Всички DMR-и, които са били определени преди лечение при всички пациенти от групата жени в непълна ремисия след лечение отново се срещат в 50% и повече от пациентите. Само един DMR - този асоцииран с *EXOSC6* гена от 77 DMR-и, който не се установява преди лечението се среща в същата група след лечение. Всички пациенти в тази група имат хиперметилиран остров CpG: 124 на *EXOSC6* , който е разположен вътрегенно. Тези данни все още не могат да се тълкуват еднозначно, тъй като ефектът

на метилирането в региони различни от промоторите не е еднозначно определен [491, 492]. Точната функция на продукта, кодиран от този ген за момента не е известна, но се предполага, че играе роля в деградацията на иРНК [576]. За момента няма данни за неговото участие в патогенезата на шизофренията.

В групата на мъжете в непълна ремисия според нашите критерии за значимост не се установяват гени с DMR-и от значение за ефекта от лечението. Най-вероятно това се дължи на малкия брой пациенти в групата и нейната хетерогенност по отношение на ефекта от лечението.

При пациентите от женски пол в пълна ремисия установяваме два гена с DMR-и с отношение към заболяването: *MIR181C* (в групата преди лечение) и *BCOR* (в групата след лечение). Тези гени не са от значение за заболяването, тъй като са засегнати различни CpG острови при отделните пациенти в групата. Предполагаме, че това е резултат от малкия брой изследвани пациенти. Като потенциална причина може да се приемат и субективните методи по отношение на поставянето на диагнозата. Трябва също да се има предвид, че епигенетичните модификации са чувствителни към факторите на околната среда.

Анализът на данните в групата на пациентите мъже в пълна ремисия показва по-интересни резултати. Идентифицирани са 9 специфични DMR-и при пациентите преди лечение (*C16orf70, CST3, DDRGK1, FA2H, FLJ30058, MFSD2B, RFX4, UBE2J1, ZNF311*) и 6 DMR-и след лечение (*AP1S3, C16orf59, KCNK15, LOC146336, MGC16384, XRN2*). Всички специфични DMR-и на тези гени касаят един и същ CpG остров на гена при всички пациенти и показват еднакъв метилационен профил. По тази причина ги приемаме като вероятни кандидати с отношение към етиопатогенезата на заболяването и ефекта от терапията. Въпреки малкия брой пациенти в групата предполагаме, че тези резултати се дължат на хомогенността на групата и поставянето на диагнозата.

Някои от тези гени участват в регулирането на транскрипцията, сфинголипидния метаболизъм и разграждането на белтъците, докато функцията на другите все още е неизвестна. Четири гена с DMR-и са хиперметилирани преди лечение (два в промоторната област, един - вътрегенно и един в далечни регулаторни участъци). Четири гена са вътрегенно хипометилирани преди лечение. След лечението пет от гените са хиперметилирани в съответните CpG острови (два в промотора, два в далечни

регулаторни участъци и един вътрегенно) и един е вътрегенно хипометилиран. Функцията на четири от гените все още е неизвестна и следователно те могат да се разглеждат като потенциални нови гени, свързани с етиологията на шизофренията. Другите идентифицирани гени са: *CST3, FA2H, RFX4, UBE2J1, ZNF311*.

CST3 генът кодира инхибитор на цистеиновата протеиназа. Обикновено продуктът на този ген се открива в биологични течности и особено в цереброспиналната течност, която заобикаля и предпазва главния и гръбначния мозък [577]. Предполагаме, че този ген е инхибиран, защото в нашето изследване преди прилагане на лечението е хипометилиран вътрегенно [491]. Функцията му е свързана с образуване на амилоидни плаки, които участват при някои мозъчни заболявания [578]. Въпреки това все още няма данни за участието на този ген в етиопатогенезата на шизофренията. Въз основа на нашите резултати предполагаме, че генът може да е от значение за развитието на заболяването.

FA2H катализира синтезата на 2-хидрокси сфинголипидите. В литературата са докладвани мутации в този ген, които участват в развитието на невродегенеративни заболявания, но не са специфично свързани с шизофрения [579, 580]. Той се експресира в мозъчните клетки [580]. В резултат на нашето проучване установяваме промоторно хипометилиране на съответния остров, което води до неговото активиране. Предполагаме, че *FA2H* може да играе роля в етиопатогенезата на шизофренията.

RFX4 и *ZNF311* кодират транскрипционни фактори. *RFX4* е свързан с мозъчни глиоми. Някои от неговите изоформи са специфични за нормална мозъчна тъкан, докато други се експресират при патологични процеси - глиоми [581, 582]. DMR на този ген е хиперметилиран в промотора, което предполага неговото деактивиране. Предполагаме, че тази промяна в метилационния профил може да допринесе за развитието на аномалии в основните мозъчни процеси и функции. Нарушената регулация на експресията на този ген може да бъде свързана с развитието на шизофрения.

UBE2J1 участва в процесите на убиквитиниране [583]. В резултат от нашето изследване установихме вътрегенно хипометилиране на изследвания остров. Промените в метилирането може да доведат до неправилно убиквитиниране като предполагаем механизъм за развитие на шизофрения.

В резултат от нашите експерименти открихме девет гена с променен метилационен профил, които са потенциални нови кандидат гени за нова лекарствена терапия. Засегнатите гени участват в няколко основни процеси като разграждане на белтъци, регулиране на транскрипцията и сфинголипидния метаболизъм. Резултатите от изследването на пациентите след лечение показват, че тези гени са възстановили степента си на метилиране. Други шест гена са променили метилационния си профил. Това може да се дължи на ефекта от лечението и компенсаторни механизми на организма. Състоянието на метилиране на DMR-ите след лечението е различно в сравнение с резултатите преди това: пет от шест гени са хиперметилирани и един е хипометилиран. Тези гени са: *AP1S3, C16orf59, KCNK15, LOC146336, MGC16384, XRN2*.

C16orf59, LOC146336, MGC16384 все още не са добре проучени и в момента тяхната функция остава неизвестна. *AP1S3* участва в сортирането на белтъците и вътреклетъчния транспорт [584]. Влиянието на антипсихотичното лечение върху експресията не е докладвано до момента, поради което този феномен има потенциала след допълнителни изследвания да бъде приет като нов маркер за оценка на ефекта от лечението.

KCNK15 кодира калиев канал [585]. В нашето изследване установяваме, че най-вероятно този ген е активиран при пациентите, тъй като изследваният CpG остров в промотора му е хипометилиран. Този ген се експресира в слуховия дял на централната нервна система. Предполагаме, че този ген се активира в резултат на антипсихотично лечение, за да компенсира някои от позитивните симптомите на шизофрения. Може да се използва като потенциален нов кандидат маркер за оценка на ефекта от терапията. Това може да се прилага при търсене на нови лекарствени мишени и по-нататъшно изясняване патологията на заболяването [586].

XRN2 гена кодира 5'-3' екзо-рибонуклеаза 2. Тя играе роля в метаболизма на РНК [587]. До този момент няма никаква информация за ефекта на антипсихотични лекарства върху експресията му. В нашето изследване установяваме хиперметилиран CpG остров, разположен в дистални регулаторни елементи, което най-вероятно активира транскрипция му.

В резултат на нашите експерименти установяваме променен метилационен профил при CpG островите на 6 гена, вероятно свързани с положителния ефект от лечението на шизофрения. Някои от гените все още са с неизвестна функция. Засегнати са няколко процеса като вътреклетъчен транспорт и РНК метаболизъм. Един от тези гени кодира калиев канал. Ефектът от лечението върху експресията на тези гени не е изследван до момента. Поради тази причина е от значение по - нататъшното изследване на тяхната роля като нови маркери за оценка на отговора към терапия.

4. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения

В настоящото проучване за първи път е използван методът на диференциалната сканираща калориметрия за изследване на кръвен серум от пациенти с шизофрения и проследяване на антипсихотичния им отговор към лечението. Диференциалната сканираща калориметрия е високо чувствителна техника за изучаване на температурно-индуцирани конформационни преходи в биологични макромолекули/белтъци и по-комплексни структури в разтвор [485, 486]. ДСК експериментът регистрира топлинния капацитет на белтък в разтвор като функция от температурата. ДСК се използва и при изследване на топлинната стабилност на белтъци в по-сложни биологични системи, биологични мембрани, плазмения протеом и други, както и при създаването на лекарствени препарати. За първи път Garbett et al. предлагат възможността за прилагането на ДСК за ранна диагностика и мониторинг на заболявания [588]. Авторите са изследвали топлинното поведение на кръвна плазма от здрави и болни индивиди и характеризират типичната термограма за здрави хора, и показват драстична модификация на термограмата при пациенти с ревматоиден артрит, лаймска болест, рак на шийката на матката и други [456, 457, 588]. Michnik et al. [459] твърдят, че има ясно изразени промени в термограмите на кръвен серум от пациенти с хронично белодробно заболяване в сравнение със здрави индивиди. На тази база, авторите смятат, че характерните за дадено заболяване термограми могат да бъдат използвани като биомаркери. Няколко повече или по-малко мащабни проучвания потвърждават тази хипотеза [459-461]. Така например проби от 30 пациенти диагностицирани с карцином на белите дробове показват уникална термограма, различна от тази на контролите [462].

Плазменият протеом на човека е изключително комплексна система. Счита се, че съдържа над 3000 белтъка и пептида в концентрации от пикограми до десетки

милиграми на милилитър, 22 от които обаче съставляват 99% от общата маса на плазмата. Албуминът представлява 60% от плазмените белтъци, глобулините – 35%, а фибриногена – 4%. Смята се, че останалият 1% съдържа потенциални биомаркери - белтъци и пептиди и съответно много ценна информация за присъствието на определени заболявания. Тези потенциални биомаркери биха могли да се определят при клинични диагностични тестове. Като алтернатива наскоро беше предложено прилагането на ДСК метод, който е изключително чувствителен към промени в количеството на плазмените белтъци и техните взаимодействия. Въпреки че методът не детектира директно биомаркерите, той демонстрира последиците от техните взаимодействия с плазмения протеом. Например свързването на бромокрезол към албумин в кръвната плазма води до значителни промени в ДСК термограмата. В този смисъл ДСК термограмите могат да дадат ценна информация, комплементарна на наличните техники за детекция на биомаркери, и може да се развие като нова диагностична техника.

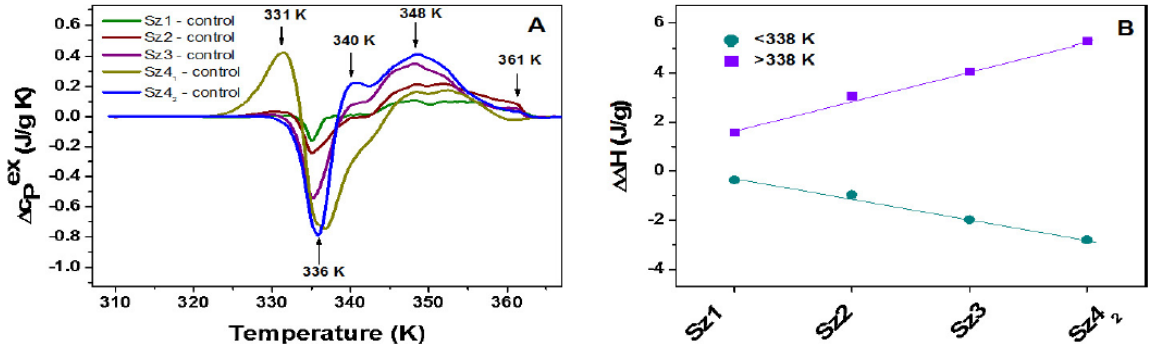
Термична стабилизация на фракцията на белтъците с най-висока концентрация в серумния протеом

Термичната стабилизация на най-големите фракции от серумни белтъци, които доминират в калориметричните профили при пациенти с шизофрения, се наблюдава като повишаване на стойността на T_{FM} при пациентите спрямо ДСК профилите на контролите. Този ефект може да се дължи на повишени нива на някои положителни белтъци от острата фаза, като компоненти на комплемента (C3 и C4), α-антитрипсин, α-кисел гликопротеин [589] също както и с промяна в термичния преход на серумния албумин. Това е илюстрирано от разликите в термограмите, получени чрез изваждане на контролната термограма от всяка от групите с шизофрения. (Фиг. 53A).

$$(\Delta c_P^{ex} = c_P^{ex}(T)_{Sz} - c_P^{ex}(T)_{control})$$

Два температурни диапазона могат да се различат при различните термограми – под и над 338K. Разликата в енталпията ($\Delta\Delta H = \Delta HSz - \Delta Hcontrol$) в температурния диапазон над 338K е по-голяма от тази под 338K за всички изследвани групи пациенти (Sz1-Sz4) (Фиг. 53B). Това показва, че при групите от пациенти с шизофрения по-голяма фракция от серумните белтъци денатурира в по-високия температурен диапазон в сравнение с контролите. При сравнението на абсолютните стойности на $\Delta\Delta H$ под и

над 338K се получава много висок коефициент на корелация r=0.9748. Това показва, че значителна част от белтъците, топящи се под 338K в контролната група постепенно се стабилизират (в реда Sz1, Sz2, Sz3, Sz4 групите) и се топят над 338 K в групите от пациентите.



Фигура 53. Разлики в термодинамичните параметри c_P^{ex} и ΔH между групите от пациенти с шизофрения и контролите. Термограми, получени чрез изваждане на типичната термограма на здрави индивиди от всяка от групите Sz1-4 (A). Разлика ($\Delta\Delta H = \Delta H_{SZ} - \Delta H_{control}$) между енталпията на групите Sz (ΔH_{SZ}) и контролната ($\Delta H_{control}$) термограми под и над 338 K (B).

При подгрупата $Sz4_1$ се наблюдава допълнителен различен пик при 332K. Той може да се дължи на белтъците от комплемента C3 и C4, които в изолирано състояние показват главни топлинни преходи при 350K и 348K и по-слаби пикове съответно при 327K и 334K. По отношение на шизофрения са докладвани прекомерна активация и следователно повишени серумни нива на белтъци от комплемента, които са основна част от неспецифичния имунен отговор [589, 590].

Понижен T1 преход

Понижаването на T1 прехода не може да се дължи на по-ниска концентрация на серумен албумин, тъй като електрофорезата на серумни белтъци не показва промяна в нивата си и в четирите изследвани групи с пациенти (Sz1 – 4). Изключение правят само 4 случая (два в група Sz1 и два от група Sz2), при които концентрацията на серумен албумин е леко под границата. По тази причина, поне част от серумен албумин трябва да се стабилизира, вероятно чрез свързване с друг протеин или лиганд, което води до изместване на прехода. Модифицираните свойства за свързване на серумен албумин

при шизофрения са в съответствие с откритието, че конформационното състояние на свързващите места на албумина е значително променено при пациенти с шизофрения в сравнение със здрави контроли [591]. От друга страна, други белтъци, намиращи се в повишени количества в серума от пациенти с шизофрения, могат да допринесат за прехода 336K. Очевидно по-малка част от фракцията на серумен албумин се стабилизира в групите Sz1 и Sz2 в сравнение с групите Sz3 и Sz4, което може да бъде свързано с различна концентрация в серума на определен(и) лиганд(и).

Повишен T_4 преход

По-силно изразеният високо-температурен T_4 преход в термограмите на групите Sz1 - Sz3 и $Sz4_2$ (93.5% от случаите с шизофрения) спрямо тези от контролната група не могат да бъдат отчетени като повишено ниво на Tf и/или IgG, тъй като чрез електрофореза на серумни белтъци не се открива промяна в β- и γ-глобулиновите фракции (когато тези белтъци мигрират). Освен IgG и Tf няма други белтъци, поне сред тези с най-висока концентрация в серума, с T_m близо до 359K. Следователно, белтъците, допринасящи за T_4 прехода в термограмите на групите Sz1-3 и $Sz4_2$ трябва да имат средна температура на прехода под 359 K при здрави индивиди, която обаче се премества към 359 K в серумния протеом на пациенти с шизофрения.

Този преход също е засегнат и при други заболявания – не се открива при рак на кръвта и епителен рак [463, 592], докато при амиотрофична латерална склероза, рак на яйчника и меланом е по-силно изразен на термограмата на пациентите, отколкото на тази при здрави индивиди [457].

Промяна на стабилността на протеома като калориметричен маркер за ефекта от лечението при шизофрения

Налице е силна нужда от обективни фактори за оценка на ефекта от лечението на пациенти с шизофрения. В тази връзка ДСК може да бъде полезен метод при условие, че определените калориметрични групи отговарят на някои промени в развитието на болестта по време на лечението с антипсихотици. Всъщност докладите на психиатри разкриват, че всички случаи с пълна ремисия се намират в група Sz1 (като техните термодинамични характеристики са подобни на тези при контролите). Групи Sz2-Sz4 (имат силно променени профили в сравнение със здрави индивиди) включват

случаи с непълна или липсваща ремисия и силно изразена положителна или отрицателна шизофренна симптоматика.

Положителната промяна в калориметричните профили при пациенти с шизофрения, т.е. тези случаи, при които се наблюдава преминаване на термограмата на пациентите с шизофрения към термограма на здрави контроли, предполага тенденция за подобряване на състоянието на пациентите в хода на лечението, докато при обратната тенденция може да се наблюдава влошаване. По този начин промяната в протеомната топлинна стабилност е потенциален маркер за ефективността на лечението. Всъщност, влошаване на шизофренните симптоми е докладвано при случаите на калориметрична промяна в групи Sz1 до Sz3, представени на фигура 51 C, D. Обратната тенденция, преминаването от $Sz4_2$ до Sz1 (случаят е показан на фиг. 51 A, B) е в съответствие с епикризата/диагнозата, поставена от психиатъра за пълна ремисия.

Една голяма група от случаите, които са претърпели положителна калориметрична промяна (50% от 23 от проследяваните пациенти) се характеризират с пълна ремисия, докато влошаване на симптомите и непълна ремисия преобладават в случаите с отрицателна промяна (20% от проследяваните случаи). Наблюдава се корелация между ефективността на проведеното лечение и термодинамичните промени в кръвен серум от пациенти с шизофрения.

VII. Заключение

Промените в метилационните и протеомните профили са динамични през индивидуалното развитие, както и под влияние на факторите на средата. В заключение в настоящото проучване за първи път в България проведохме цялостен геномен метилационен анализ и протеомен скрининг на български пациенти с шизофрения и здрави контроли, проследихме динамиката на метилационните и протеомни профили преди и след прилагане на антипсихотично лечение. Като резултат ние предложихме няколко нови кандидат гени за шизофрения, които основно участват в синаптичната трансмисия и развитието на нервната система. Най-вероятният кандидат ген е *CASP3*, която играе важна роля в процеса на апоптоза и регулирането на невротрансмисията. Установихме полово-специфични различия като най-значими са метилационните промени в *XIAP, GABRD, OXT* и *KRT7* гените при жени пациенти. При пациентите мъже най-силни кандидати са *DHX37, MAP2K2, FNDC4* и *GIPC1*. Нашите данни потвърждават хипотезата за разлики в механизма на развитието на болестта при мъже и жени. Полово-специфични разлики се разкриха и при проследяването на промените в метилационните профили след прилагането на антипсихотично лечение. В резултат предлагаме гените *C16orf70, CST3, DDRGK1, FA2H, FLJ30058, MFSD2B, RFX4, UBE2J1* и *ZNF311,* както и *AP1S3, C16orf59, KCNK15, LOC146336, MGC16384* и *XRN2* като потенциални мишени за търсене на нови терапевтични средства, както и маркери за оценка на ефекта от лечението. Някои от тях участват в регулацията на транскрипцията, убиквитинирането и сфинголипидния метаболизъм. Други от гените са от значение за метаболизма на РНК, транспорта и сортирането на белтъците и един е калиев канал.

Въз основа на термодинамичните характеристики на кръвен серум разграничихме четири калориметрични групи при пациентите с шизофрения. Характерни особености на пациентите с шизофрения са топлинната стабилност на белтъците от фракциите с най-висока концентрация в серума и потискане на основните и повишаване на последните високо-температурни топлинни преходи. Идентифицирането на тези специфични свойства на калориметричните профили при пациенти с шизофрения се очаква да подпомогне обективната оценка на ефекта от антипсихотично лечение в бъдеще.

Метилационният и протеомният анализ предлагат огромни възможности при изследване на етиопатогенезата на мултифакторните заболявания. Настоящото изследване все още е в начален етап. Изследването ще бъде продължено с по-задълбочени проучвания в по-големи групи от пациенти.

Изводи

1. Установени са типа и честотата на метилационните и протеомните профили на пациенти с шизофрения и здрави контроли.
2. Доказани са различно метилирани райони между генома на: пациенти с шизофрения/контроли (394 DMR) и полово специфични разлики между пациенти/контроли: от мъжки пол (170 DMR) и между пациенти/контроли от женски пол (162 DMR).
3. Определени са топ 10 гените с DMR в пуловете на пациенти с шизофрения/контроли; пациенти/контроли от мъжки пол и пациенти/контроли от женски пол.
4. Номиниран е *CASP3* като кандидат ген за шизофрения с променен метилационен профил. Предложена е хипотеза за епигенетични нарушения на апоптозата в патогенезата на заболяването.
5. Потвърдени са най-значимите полово специфични DMR от пул анализа в индивидуални проби от пациенти/контроли.
6. Установена е динамиката в метилационните профили при мъже с шизофрения в ремисия преди и след лечение: DMR в гените *C16orf70, CST3, DDRGK1, FA2H, FLJ30058, MFSD2B, RFX4, UBE2J1, ZNF311* преди лечение и DMR в гените *AP1S3, C16orf59, KCNK15, LOC146336, MGC16384* и *XRN2* след лечение.
7. Открита е динамика в калориметричните профили при пациенти с шизофрения/контроли преди и след лечение.

Приноси

Приноси с научен характер

- Установени са кандидат гени с DMR-и, имащи отношение към развитието и лечението на шизофрения.
- Предложен е нов епигенетичен механизъм в патогенезата на шизофренията, свързан с апоптозата.
- Установени са разлики в калориметричните профили, имащи отношение към развитието на шизофрения и ефекта от лечението.

Приноси с приложен характер

- За първи път е въведен, оптимизиран и приложен метода на метилационния ДНК микрочипов анализ при пациенти с шизофрения.
- Предложено е, прилагането на комбинация от ДНК метилационен микрочипов анализ и протеомен анализ като стратегия за по-цялостно изследване на шизофрения.
- Разширена е ДНК банката от пациенти с шизофрения и е създадена нова банка от серумни проби от пациенти и контроли, предоставящи възможност за по-мащабни бъдещи проучвания.

VIII. Литература:

1. Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC: **The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(1):14-27.
2. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC: **Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies**. *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(12):1187-1192.
3. Sullivan P: **The genetics of schizophrenia.** *PLoS Med* 2005, **2**(7):e212.
4. Riley B, Kendler KS: **Molecular genetic studies of schizophrenia**. *Eur J Hum Genet* 2006, **14**(6):669-680.
5. van Os J, Kapur S: **Schizophrenia**. *The Lancet*, **374**(9690):635-645.
6. **Schizophrenia** [http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/]
7. НЦЗИ: **http://ncphp.government.bg/**. 2013.
8. Oliver EA, Fearon P: **Schizophrenia: epidemiology and risk factors**. *Psychiatry* 2008, **7**(10):410-414.
9. Rajji TK, Ismail Z, Mulsant BH: **Age at onset and cognition in schizophrenia: meta-analysis**. *The British Journal of Psychiatry* 2009, **195**(4):286-293.
10. van Os J, Kapur S: **Schizophrenia**. *The Lancet* 2009, **374**(9690):635-645.
11. Kumra S, Shaw M, Merka P, Nakayama E, Augustin R: **Childhood-onset schizophrenia: research update**. *Can J Psychiatry* 2001, **46**(10):923-930.
12. Hoff AL, Harris D, Faustman WO, Beal M, DeVilliers D, Mone RD, Moses JA, Csernansky JG: **A neuropsychological study of early onset schizophrenia**. *Schizophrenia Research* 1996, **20**(1):21-28.
13. Picchioni MM, Murray RM: **Schizophrenia**. *BMJ* 2007, **335**(7610):91-95.
14. Castle D, Wessely S, Der G, Murray RM: **The incidence of operationally defined schizophrenia in Camberwell, 1965-84**. *The British Journal of Psychiatry* 1991, **159**(6):790-794.
15. Hodgson R, Wildgust HJ, Bushe CJ: **Cancer and schizophrenia: is there a paradox?** *J Psychopharmacol* 2010, **24**(4 Suppl):51-60.
16. Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ: **Finding schizophrenia genes**. *J Clin Invest* 2005, **115**(6):1440-1448.
17. Health NIoM: **http://www.nimh.nih.gov/index.shtml**. In.; 2014.
18. Beers MHaRB: **The Merck Manual of Diagnosis & Therapy**. *Merck Research Laboratories* 1999.
19. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS: **Schizophrenia, "Just the Facts" 5. Treatment and prevention Past, present, and future**. *Schizophrenia Research* 2010, **122**(1–3):1-23.
20. Delay J, Deniker P, Harl JM: **[Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states]**. *Ann Med Psychol (Paris)* 1952, **110**(2 2):267-273.
21. Kapur S, Remington G: **Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient**. *Biol Psychiatry* 2001, **50**(11):873-883.
22. Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S: **Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia**. *Am J Psychiatry* 2000, **157**(4):514-520.
23. Kapur S, Mizrahi R, Li M: **From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis**. *Schizophr Res* 2005, **79**(1):59-68.
24. Emsley R, Rabinowitz J, Medori R: **Time course for antipsychotic treatment response in first-episode schizophrenia**. *Am J Psychiatry* 2006, **163**(4):743-745.
25. Leucht S, Busch R, Hamann J, Kissling W, Kane JM: **Early-onset hypothesis of antipsychotic drug action: a hypothesis tested, confirmed and extended**. *Biol Psychiatry* 2005, **57**(12):1543-1549.
26. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS: **Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization**. *Schizophrenia Research* 2009, **110**(1):1-23.

27. Henry A. Nasrallah MDRT, M.D. : **Classic Antipsychotic Medications**. In.; 2009.
28. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H: **Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine**. *Arch Gen Psychiatry* 1988, **45**(9):789-796.
29. Meltzer HY, Alphs L, Green AI, Altamura AC, Anand R, Bertoldi A, Bourgeois M, Chouinard G, Islam MZ, Kane J *et al*: **Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT)**. *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(1):82-91.
30. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM: **Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis**. *Lancet* 2009, **373**(9657):31-41.
31. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, Samara M, Barbui C, Engel RR, Geddes JR *et al*: **Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis**. *Lancet* 2013, **382**(9896):951-962.
32. Culpepper L: **A Roadmap to Key Pharmacologic Principles in Using Antipsychotics**. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 2007, **9**(6):444–454.
33. Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD *et al*: **Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia**. *N Engl J Med* 2005, **353**(12):1209-1223.
34. Keefe RS, Bilder RM, Davis SM, Harvey PD, Palmer BW, Gold JM, Meltzer HY, Green MF, Capuano G, Stroup TS *et al*: **Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial**. *Arch Gen Psychiatry* 2007, **64**(6):633-647.
35. Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, Davidson M, Vergouwe Y, Keet IP, Gheorghe MD, Rybakowski JK, Galderisi S, Libiger J *et al*: **Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial**. *Lancet* 2008, **371**(9618):1085-1097.
36. Jones PB, Barnes TR, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP, Murray RM, Markwick A, Lewis SW: **Randomized controlled trial of the effect on Quality of Life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUtLASS 1)**. *Arch Gen Psychiatry* 2006, **63**(10):1079-1087.
37. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS: **Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization**. *Schizophr Res* 2009, **110**(1-3):1-23.
38. Leucht S, Arbter D, Engel RR, Kissling W, Davis JM: **How effective are second-generation antipsychotic drugs? A meta-analysis of placebo-controlled trials**. *Mol Psychiatry* 2009, **14**(4):429-447.
39. Kinon BJ, Chen L, Ascher-Svanum H, Stauffer VL, Kollack-Walker S, Zhou W, Kapur S, Kane JM: **Early response to antipsychotic drug therapy as a clinical marker of subsequent response in the treatment of schizophrenia**. *Neuropsychopharmacology* 2010, **35**(2):581-590.
40. Chakos M, Lieberman J, Hoffman E, Bradford D, Sheitman B: **Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia: a review and meta-analysis of randomized trials**. *Am J Psychiatry* 2001, **158**(4):518-526.
41. Stahl SM, Buckley PF: **Negative symptoms of schizophrenia: a problem that will not go away**. *Acta Psychiatr Scand* 2007, **115**(1):4-11.
42. Tandon R, Ribeiro SCM, DeQuardo JR, Goldman RS, Goodson J, Greden JF: **Covariance of positive and negative symptoms during neuroleptic treatment in schizophrenia: A replication**. *Biological Psychiatry* 1993, **34**(7):495-497.
43. Hill SK, Bishop JR, Palumbo D, Sweeney JA: **Effect of second-generation antipsychotics on cognition: current issues and future challenges**. *Expert Rev Neurother* 2010, **10**(1):43-57.
44. Leucht S, Barnes TR, Kissling W, Engel RR, Correll C, Kane JM: **Relapse prevention in schizophrenia with new-generation antipsychotics: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized, controlled trials**. *Am J Psychiatry* 2003, **160**(7):1209-1222.
45. Must A, Janka Z, Horvath S: **[Schizophrenia, environment and epigenetics]**. *Neuropsychopharmacol Hung* 2011, **13**(4):211-217.

46. Balla P, Frecska E: **[Changes in the brain with schizophrenia: postmortem findings]**. *Neuropsychopharmacol Hung* 2011, **13**(4):219-227.
47. Tenyi T: **Neurodevelopment and schizophrenia: data on minor physical anomalies and structural brain imaging**. *Neuropsychopharmacol Hung* 2011, **13**(4):229-232.
48. Modinos G, Iyegbe C, Prata D, Rivera M, Kempton MJ, Valmaggia LR, Sham PC, van Os J, McGuire P: **Molecular genetic gene-environment studies using candidate genes in schizophrenia: a systematic review**. *Schizophr Res* 2013, **150**(2-3):356-365.
49. Murray RM, Jones PB, Susser E, Os Jv, Cannon M: **The Epidemiology of Schizophrenia**, vol. 1, I edn. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
50. Sullivan PF: **The genetics of schizophrenia**. *PLoS Med* 2005, **2**(7):e212.
51. Betcheva E: **Association studies of single nucleotide polymorphisms in bulgarian patients with schizophrenia and healthy control through whole genome scan**. Sofia: Medical University; 2010.
52. Stefan M, Travis M, Murray RM: **An atlas of schizophrenia**, vol. 1. London: The Parthenon Publishing Group; 2002.
53. Munk-Jorgensen P, Ewald H: **Epidemiology in neurobiological research: exemplified by the influenza-schizophrenia theory**. *Br J Psychiatry Suppl* 2001, **40**:s30-32.
54. Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D: **Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic**. *Arch Gen Psychiatry* 1988, **45**(2):189-192.
55. Brown AS, Susser ES: **In utero infection and adult schizophrenia**. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002, **8**(1):51-57.
56. Murray RM, Lewis SW: **Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?** *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987, **295**(6600):681-682.
57. Yolken RH, Torrey EF: **Viruses, schizophrenia, and bipolar disorder**. *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**(1):131-145.
58. Torrey EF, Yolken RH: **Toxoplasma gondii and schizophrenia**. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(11):1375-1380.
59. Brown AS, Cohen P, Greenwald S, Susser E: **Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella**. *Am J Psychiatry* 2000, **157**(3):438-443.
60. Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, Yolken RH: **Maternal infections and subsequent psychosis among offspring**. *Arch Gen Psychiatry* 2001, **58**(11):1032-1037.
61. Gattaz WF, Abrahao AL, Foccacia R: **Childhood meningitis, brain maturation and the risk of psychosis**. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004, **254**(1):23-26.
62. Opler MG, Susser ES: **Fetal environment and schizophrenia**. *Environ Health Perspect* 2005, **113**(9):1239-1242.
63. Messias EL, Chen CY, Eaton WW: **Epidemiology of schizophrenia: review of findings and myths**. *Psychiatr Clin North Am* 2007, **30**(3):323-338.
64. Geddes JR, Verdoux H, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, Eagles JM, Heun R, McCreadie RG, McNeil TF, O'Callaghan E *et al*: **Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis**. *Schizophr Bull* 1999, **25**(3):413-423.
65. Cannon M, Jones PB, Murray RM: **Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review**. *Am J Psychiatry* 2002, **159**(7):1080-1092.
66. Susser ES, Lin SP: **Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945**. *Arch Gen Psychiatry* 1992, **49**(12):983-988.
67. Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT: **Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study**. *Am J Psychiatry* 2000, **157**(2):196-202.
68. Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J: **A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia**. *Schizophr Bull* 2003, **29**(3):587-593.
69. Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH: **Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature**. *Schizophr Res* 1997, **28**(1):1-38.

70. Carrion-Baralt JR, Smith CJ, Rossy-Fullana E, Lewis-Fernandez R, Davis KL, Silverman JM: **Seasonality effects on schizophrenic births in multiplex families in a tropical island**. *Psychiatry Res* 2006, **142**(1):93-97.
71. Gregory I: **Factors influencing first admission rates to Canadian mental hospitals. II. An analysis of provincial differences, 1950-1952**. *Can Psychiatr Assoc J* 1959, **4**(1):51-60.
72. Kinnell HG: **Parental age in schizophrenia**. *Br J Psychiatry* 1983, **142**:204.
73. Zammit S, Allebeck P, Dalman C, Lundberg I, Hemmingson T, Owen MJ, Lewis G: **Paternal age and risk for schizophrenia**. *Br J Psychiatry* 2003, **183**:405-408.
74. Byrne M, Agerbo E, Ewald H, Eaton WW, Mortensen PB: **Parental age and risk of schizophrenia: a case-control study**. *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(7):673-678.
75. Aleman A, Kahn RS, Selten JP: **Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis**. *Arch Gen Psychiatry* 2003, **60**(6):565-571.
76. Sipos A, Rasmussen F, Harrison G, Tynelius P, Lewis G, Leon DA, Gunnell D: **Paternal age and schizophrenia: a population based cohort study**. *BMJ* 2004, **329**(7474):1070.
77. Eaton WW, Hayward C, Ram R: **Schizophrenia and rheumatoid arthritis: a review**. *Schizophr Res* 1992, **6**(3):181-192.
78. in 't Veld BA, Launer LJ, Breteler MM, Hofman A, Stricker BH: **Pharmacologic agents associated with a preventive effect on Alzheimer's disease: a review of the epidemiologic evidence**. *Epidemiol Rev* 2002, **24**(2):248-268.
79. Etminan M, Gill S, Samii A: **Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies**. *BMJ* 2003, **327**(7407):128.
80. DeLisi LE, Boccio AM, Riordan H, Hoff AL, Dorfman A, McClelland J, Kushner M, Van Eyl O, Oden N: **Familial thyroid disease and delayed language development in first admission patients with schizophrenia**. *Psychiatry Res* 1991, **38**(1):39-50.
81. Wright P, Sham PC, Gilvarry CM, Jones PB, Cannon M, Sharma T, Murray RM: **Autoimmune diseases in the pedigrees of schizophrenic and control subjects**. *Schizophr Res* 1996, **20**(3):261-267.
82. Eaton W, Mortensen PB, Agerbo E, Byrne M, Mors O, Ewald H: **Coeliac disease and schizophrenia: population based case control study with linkage of Danish national registers**. *BMJ* 2004, **328**(7437):438-439.
83. Dohan FC: **Hypothesis: genes and neuroactive peptides from food as cause of schizophrenia**. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1980, **22**:535-548.
84. Ganguli R, Brar JS, Rabin BS: **Immune abnormalities in schizophrenia: evidence for the autoimmune hypothesis**. *Harv Rev Psychiatry* 1994, **2**(2):70-83.
85. Rothermundt M, Arolt V, Bayer TA: **Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia**. *Brain Behav Immun* 2001, **15**(4):319-339.
86. Muller N, Riedel M, Scheppach C, Brandstatter B, Sokullu S, Krampe K, Ulmschneider M, Engel RR, Moller HJ, Schwarz MJ: **Beneficial antipsychotic effects of celecoxib add-on therapy compared to risperidone alone in schizophrenia**. *Am J Psychiatry* 2002, **159**(6):1029-1034.
87. Dickerson FB, Boronow JJ, Stallings CR, Origoni AE, Yolken RH: **Reduction of symptoms by valacyclovir in cytomegalovirus-seropositive individuals with schizophrenia**. *Am J Psychiatry* 2003, **160**(12):2234-2236.
88. Hall W, Degenhardt L: **Cannabis use and psychosis: a review of clinical and epidemiological evidence**. *Aust N Z J Psychiatry* 2000, **34**(1):26-34.
89. Weiser M, Reichenberg A, Rabinowitz J, Kaplan Z, Caspi A, Yasvizky R, Mark M, Knobler HY, Nahon D, Davidson M: **Self-reported drug abuse in male adolescents with behavioral disturbances, and follow-up for future schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 2003, **54**(6):655-660.
90. van Os J, Bak M, Hanssen M, Bijl RV, de Graaf R, Verdoux H: **Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study**. *Am J Epidemiol* 2002, **156**(4):319-327.

91. Barnes TR, Mutsatsa SH, Hutton SB, Watt HC, Joyce EM: **Comorbid substance use and age at onset of schizophrenia**. *Br J Psychiatry* 2006, **188**:237-242.
92. Degenhardt L, Hall W: **Is cannabis use a contributory cause of psychosis?** *Can J Psychiatry* 2006, **51**(9):556-565.
93. Henquet C, Murray R, Linszen D, van Os J: **The environment and schizophrenia: the role of cannabis use**. *Schizophr Bull* 2005, **31**(3):608-612.
94. Eaton W HG: **Life chances, life planning, and schizophrenia: a review and interpretation of research on social deprivation.** *International Journal of Mental Health* 2001(30):58–81.
95. Amore M, Balista C, Di Fazio C, Merli V, Ferrari G, McCreadie RG: **Obstetric complications and breast feeding in schizophrenia**. *J Nerv Ment Dis* 2002, **190**(10):705-707.
96. McCreadie RG: **The Nithsdale Schizophrenia Surveys. 16. Breast-feeding and schizophrenia: preliminary results and hypotheses**. *Br J Psychiatry* 1997, **170**:334-337.
97. Torrey EF, Yolken RH: **At issue: is household crowding a risk factor for schizophrenia and bipolar disorder?** *Schizophr Bull* 1998, **24**(3):321-324.
98. van Os J, Krabbendam L, Myin-Germeys I, Delespaul P: **The schizophrenia envirome**. *Curr Opin Psychiatry* 2005, **18**(2):141-145.
99. Wicks S, Hjern A, Gunnell D, Lewis G, Dalman C: **Social adversity in childhood and the risk of developing psychosis: a national cohort study**. *Am J Psychiatry* 2005, **162**(9):1652-1657.
100. Morgan C, Kirkbride J, Leff J, Craig T, Hutchinson G, McKenzie K, Morgan K, Dazzan P, Doody GA, Jones P *et al*: **Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study**. *Psychol Med* 2007, **37**(4):495-503.
101. Morgan C, Fisher H: **Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review**. *Schizophr Bull* 2007, **33**(1):3-10.
102. Cannon M CM: **Epidemiology and risk factors**. *Psychiatry* 2006, **4**:7–10.
103. Cooper C, Morgan C, Byrne M, Dazzan P, Morgan K, Hutchinson G, Doody GA, Harrison G, Leff J, Jones P *et al*: **Perceptions of disadvantage, ethnicity and psychosis**. *Br J Psychiatry* 2008, **192**(3):185-190.
104. **Recovery From Schizophrenia: An International Perspective. A Report From the WHO Collaborative Project, the International Study of Schizophrenia**. *American Journal of Psychiatry* 2007, **164**(9):1444-1445.
105. Boydell J, van Os J, McKenzie K, Allardyce J, Goel R, McCreadie RG, Murray RM: **Incidence of schizophrenia in ethnic minorities in London: ecological study into interactions with environment**. *BMJ* 2001, **323**(7325):1336-1338.
106. Eaton W, Harrison G: **Ethnic disadvantage and schizophrenia**. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 2000(407):38-43.
107. Leao TS, Sundquist J, Frank G, Johansson LM, Johansson SE, Sundquist K: **Incidence of schizophrenia or other psychoses in first- and second-generation immigrants: a national cohort study**. *J Nerv Ment Dis* 2006, **194**(1):27-33.
108. Hutchinson G, Takei N, Fahy TA, Bhugra D, Gilvarry C, Moran P, Mallett R, Sham P, Leff J, Murray RM: **Morbid risk of schizophrenia in first-degree relatives of white and African-Caribbean patients with psychosis**. *Br J Psychiatry* 1996, **169**(6):776-780.
109. Sugarman PA, Craufurd D: **Schizophrenia in the Afro-Caribbean community**. *Br J Psychiatry* 1994, **164**(4):474-480.
110. Veling W, Selten JP, Susser E, Laan W, Mackenbach JP, Hoek HW: **Discrimination and the incidence of psychotic disorders among ethnic minorities in The Netherlands**. *Int J Epidemiol* 2007, **36**(4):761-768.
111. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J: **Molecular mechanisms of schizophrenia**. *Cell Physiol Biochem* 2007, **20**(6):687-702.
112. Hirvonen M, Laakso A, Nagren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J: **C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(12):1060-1061.

113. Seeman P, Kapur S: **Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(14):7673-7675.
114. Curran C, Byrappa N, McBride A: **Stimulant psychosis: systematic review**. *Br J Psychiatry* 2004, **185**:196-204.
115. Stefan M, Travis, M.: **An atlas of schizophrenia**. Loindon: The Parthenon Publishing Group; 2002.
116. Dubertret C, Gorwood P, Gouya L, Deybach JC, Ades J: **Association and excess of transmission of a DRD2 haplotype in a sample of French schizophrenic patients**. *Schizophr Res* 2001, **49**(1-2):203-212.
117. Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, Hamon M, Gorwood P: **The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia**. *Schizophr Res* 2004, **67**(1):75-85.
118. Arinami T, Itokawa M, Enguchi H, Tagaya H, Yano S, Shimizu H, Hamaguchi H, Toru M: **Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia**. *Lancet* 1994, **343**(8899):703-704.
119. Laurent C, Bodeau-Pean S, Campion D, d'Amato T, Jay M, Dollfus S, Thibault F, Petit M, Samolyk D, Martinez M *et al*: **No major role for the dopamine D2 receptor Ser-->Cys311 mutation in schizophrenia**. *Psychiatr Genet* 1994, **4**(4):229-230.
120. Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M: **A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia**. *Hum Mol Genet* 1997, **6**(4):577-582.
121. Lawford BR, Young RM, Swagell CD, Barnes M, Burton SC, Ward WK, Heslop KR, Shadforth S, van Daal A, Morris CP: **The C/C genotype of the C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor is associated with schizophrenia**. *Schizophr Res* 2005, **73**(1):31-37.
122. Hoenicka J, Aragues M, Rodriguez-Jimenez R, Ponce G, Martinez I, Rubio G, Jimenez-Arriero MA, Palomo T: **C957T DRD2 polymorphism is associated with schizophrenia in Spanish patients**. *Acta Psychiatr Scand* 2006, **114**(6):435-438.
123. Staddon S, Arranz MJ, Mancama D, Perez-Nievas F, Arrizabalaga I, Anney R, Buckland P, Elkin A, Osborne S, Munro J *et al*: **Association between dopamine D3 receptor gene polymorphisms and schizophrenia in an isolate population**. *Schizophr Res* 2005, **73**(1):49-54.
124. Reynolds GP, Yao Z, Zhang X, Sun J, Zhang Z: **Pharmacogenetics of treatment in first-episode schizophrenia: D3 and 5-HT2C receptor polymorphisms separately associate with positive and negative symptom response**. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005, **15**(2):143-151.
125. Lane HY, Hsu SK, Liu YC, Chang YC, Huang CH, Chang WH: **Dopamine D3 receptor Ser9Gly polymorphism and risperidone response**. *J Clin Psychopharmacol* 2005, **25**(1):6-11.
126. Collier DA, Li T: **The genetics of schizophrenia: glutamate not dopamine?** *Eur J Pharmacol* 2003, **480**(1-3):177-184.
127. Gourion D, Goldberger C, Leroy S, Bourdel MC, Olie JP, Krebs MO: **Age at onset of schizophrenia: interaction between brain-derived neurotrophic factor and dopamine D3 receptor gene variants**. *Neuroreport* 2005, **16**(12):1407-1410.
128. Guillin O, Demily C, Thibaut F: **Brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and its relation with dopamine**. *Int Rev Neurobiol* 2007, **78**:377-395.
129. Zintzaras E: **Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and schizophrenia: a meta-analysis**. *Psychiatr Genet* 2007, **17**(2):69-75.
130. Gallinat J, Gotz T, Kalus P, Bajbouj M, Sander T, Winterer G: **Genetic variations of the NR3A subunit of the NMDA receptor modulate prefrontal cerebral activity in humans**. *J Cogn Neurosci* 2007, **19**(1):59-68.
131. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS: **Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses**. *Arch Gen Psychiatry* 1994, **51**(3):199-214.

132. Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, Avedisova AS, Bardenstein LM, Gurovich IY, Morozova MA *et al*: **Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial**. *Nat Med* 2007, **13**(9):1102-1107.
133. Deng X, Shibata H, Takeuchi N, Rachi S, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y: **Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes SLC1A1, SLC1A3, and SLC1A6 with schizophrenia**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007, **144B**(3):271-278.
134. Deng X, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y: **Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia**. *BMC Psychiatry* 2004, **4**:21.
135. Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L, Liu H *et al*: **Significant Association Between the Genetic Variations in the 5′ End of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit Gene GRIN1 and Schizophrenia**. *Biological Psychiatry*, **59**(8):747-753.
136. Norton N, Moskvina V, Morris DW, Bray NJ, Zammit S, Williams NM, Williams HJ, Preece AC, Dwyer S, Wilkinson JC *et al*: **Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**(1):96-101.
137. Li D, Collier DA, He L: **Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia**. *Human Molecular Genetics* 2006, **15**(12):1995-2002.
138. Gu Z, Jiang Q, Fu AK, Ip NY, Yan Z: **Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex**. *J Neurosci* 2005, **25**(20):4974-4984.
139. Hahn C-G, Wang H-Y, Cho D-S, Talbot K, Gur RE, Berrettini WH, Bakshi K, Kamins J, Borgmann-Winter KE, Siegel SJ *et al*: **Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA> receptor hypofunction in schizophrenia**. *Nat Med* 2006, **12**(7):824-828.
140. Walss-Bass C, Liu W, Lew DF, Villegas R, Montero P, Dassori A, Leach RJ, Almasy L, Escamilla M, Raventos H: **A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 2006, **60**(6):548-553.
141. Hall J, Whalley HC, Job DE, Baig BJ, McIntosh AM, Evans KL, Thomson PA, Porteous DJ, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC *et al*: **A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms**. *Nat Neurosci* 2006, **9**(12):1477-1478.
142. Turunen JA, Peltonen JO, Pietilainen OP, Hennah W, Loukola A, Paunio T, Silander K, Ekelund J, Varilo T, Partonen T *et al*: **The role of DTNBP1, NRG1, and AKT1 in the genetics of schizophrenia in Finland**. *Schizophr Res* 2007, **91**(1-3):27-36.
143. Boucher AA, Arnold JC, Duffy L, Schofield PR, Micheau J, Karl T: **Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Delta9-tetrahydrocannabinol**. *Psychopharmacology (Berl)* 2007, **192**(3):325-336.
144. Falkai P, Maier W: **[Advances in neurobiological understanding of schizophrenia. Perspectives for new therapeutic concepts]**. *Nervenarzt* 2006, **77 Suppl 2**:S65-74; quiz S75-66.
145. Burdick KE, Funke B, Goldberg JF, Bates JA, Jaeger J, Kucherlapati R, Malhotra AK: **COMT genotype increases risk for bipolar I disorder and influences neurocognitive performance**. *Bipolar Disord* 2007, **9**(4):370-376.
146. Lang UE, Puls I, Müller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J: **Molecular Mechanisms of Schizophrenia**. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007, **20**(6):687-702.
147. Reynolds GP, Harte MK: **The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms**. *Biochem Soc Trans* 2007, **35**(Pt 2):433-436.
148. Addington AM, Gornick M, Duckworth J, Sporn A, Gogtay N, Bobb A, Greenstein D, Lenane M, Gochman P, Baker N *et al*: **GAD1 (2q31.1), which encodes glutamic acid decarboxylase (GAD67), is associated with childhood-onset schizophrenia and cortical gray matter volume loss**. *Mol Psychiatry* 2005, **10**(6):581-588.

149. Dean B: **Understanding the pathology of schizophrenia: recent advances from the study of the molecular architecture of postmortem CNS tissue**. *Postgrad Med J* 2002, **78**(917):142-148.
150. Raedler TJ, Knable MB, Weinberger DR: **Schizophrenia as a developmental disorder of the cerebral cortex**. *Curr Opin Neurobiol* 1998, **8**(1):157-161.
151. Harrison PJ: **The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation**. *Brain* 1999, **122 (Pt 4)**:593-624.
152. Weinberger DR: **Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 1999, **45**(4):395-402.
153. Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA: **Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies**. *Br J Psychiatry* 2006, **188**:510-518.
154. Roberts RC: **Schizophrenia in translation: disrupted in schizophrenia (DISC1): integrating clinical and basic findings**. *Schizophr Bull* 2007, **33**(1):11-15.
155. Roberts RC, Roche JK, Conley RR: **Synaptic differences in the patch matrix compartments of subjects with schizophrenia: a postmortem ultrastructural study of the striatum**. *Neurobiol Dis* 2005, **20**(2):324-335.
156. Bechter K: **[The mild encephalitis-hypothesis--new findings and studies]**. *Psychiatr Prax* 2004, **31 Suppl 1**:S41-43.
157. MÜller N, Schwarz M: **Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission**. *Neurotoxicity Research* 2006, **10**(2):131-148.
158. Babulas V, Factor-Litvak P, Goetz R, Schaefer CA, Brown AS: **Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia**. *Am J Psychiatry* 2006, **163**(5):927-929.
159. Brown AS: **Prenatal Infection as a Risk Factor for Schizophrenia**. *Schizophrenia Bulletin* 2006, **32**(2):200-202.
160. Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH: **Antibodies to Toxoplasma gondii in patients with schizophrenia: a meta-analysis**. *Schizophr Bull* 2007, **33**(3):729-736.
161. Schwarz MJ, Riedel M, Ackenheil M, Muller N: **Decreased levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in unmedicated and medicated schizophrenic patients**. *Biol Psychiatry* 2000, **47**(1):29-33.
162. Avgustin B, Wraber B, Tavcar R: **Increased Th1 and Th2 immune reactivity with relative Th2 dominance in patients with acute exacerbation of schizophrenia**. *Croat Med J* 2005, **46**(2):268-274.
163. Zhang XY, Zhou DF, Zhang PY, Wu GY, Cao LY, Shen YC: **Elevated interleukin-2, interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in neuroleptic-free schizophrenia: association with psychopathology**. *Schizophr Res* 2002, **57**(2-3):247-258.
164. Rudolf S, Peters M, Rothermundt M, Arolt V, Kirchner H: **The influence of typical and atypical neuroleptic drugs in the production of interleukin-2 and interferon-gamma in vitro**. *Neuropsychobiology* 2002, **46**(4):180-185.
165. Shirts BH, Wood J, Yolken RH, Nimgaonkar VL: **Association study of IL10, IL1beta, and IL1RN and schizophrenia using tag SNPs from a comprehensive database: suggestive association with rs16944 at IL1beta**. *Schizophr Res* 2006, **88**(1-3):235-244.
166. Mata I, Crespo-Facorro B, Perez-Iglesias R, Carrasco-Marin E, Arranz MJ, Pelayo-Teran JM, Leyva-Cobian F, Vazquez-Barquero JL: **Association between the interleukin-1 receptor antagonist gene and negative symptom improvement during antipsychotic treatment**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**(8):939-943.
167. Papiol S, Molina V, Desco M, Rosa A, Reig S, Gispert JD, Sanz J, Palomo T, Fananas L: **Ventricular enlargement in schizophrenia is associated with a genetic polymorphism at the interleukin-1 receptor antagonist gene**. *Neuroimage* 2005, **27**(4):1002-1006.

168. Schwarz MJ, Krönig H, Riedel M, Dehning S, Douhet A, Spellmann I, Ackenheil M, Möller HJ, Müller N: **IL-2 and IL-4 polymorphisms as candidate genes in schizophrenia**. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2006, **256**(2):72-76.
169. Costa E DE, Grayson DR, Ruzicka WB, Simonini MV, Veldic M, Guidotti A.: **Epigenetic targets in GABAergic neurons to treat schizophrenia.** *Adv Pharmacol* 2006 **54**:95-117.
170. Petronis A: **The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis**. *Biol Psychiatry* 2004, **55**(10):965-970.
171. Costa E DE, Grayson DR, Guidotti A, Veldic M **DNA methylation as an epigenetic signature in psychosis vulnerability.** *Epigenetics* 2007, **2**:29-36.
172. Garrone G: **[Statistical and genetic study of schizophrenia in Geneva from 1901 to 1950]**. *J Genet Hum* 1962, **11**:91-219.
173. Slater E: **The monogenic theory of schizophrenia**. *Acta Genet Stat Med* 1958, **8**(1):50-56.
174. Risch N, Baron M: **Segregation analysis of schizophrenia and related disorders**. *Am J Hum Genet* 1984, **36**(5):1039-1059.
175. McGue M, Gottesman, II, Rao DC: **The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model**. *Am J Hum Genet* 1983, **35**(6):1161-1178.
176. Murray RM, Lewis SW, Reveley AM: **Towards an aetiological classification of schizophrenia**. *Lancet* 1985, **1**(8436):1023-1026.
177. Sham P: **Genetic epidemiology**. *Br Med Bull* 1996, **52**(3):408-433.
178. Schork NJ: **Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions**. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**(4 Pt 2):S103-109.
179. Bassett AS, Chow EW, O'Neill S, Brzustowicz LM: **Genetic insights into the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia**. *Schizophr Bull* 2001, **27**(3):417-430.
180. Owen M, O'Donovan, M.: **Genetics of Schizophrenia**. *Psychiatry* 2008.
181. Тончева пД: **Медицинска генетика в постгеномната ера/Геномна медицина**. 2010.
182. Kendler KS, Diehl, S. R.: **Schizophrenia: genetics**. In: *Comprehensive Textbook of Psychiatry, VI* Edited by Kaplan HIS, B. J. Baltimore: Williams and Wilkins 1985: 942-957.
183. Moldin SO: **Sponsoring initiatives in the molecular genetics of mental disorders.** In: *Genetics and Mental Disorders : Report of the NIMH Genetics Workgroup.* Bethesda: NIH 1998: 98-4268
184. Gottesman II: **Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness.** New York: W. H. Freeman 1991.
185. Waddington JL, Youssef HA: **Familial-genetic and reproductive epidemiology of schizophrenia in rural Ireland: age at onset, familial morbid risk and parental fertility**. *Acta Psychiatr Scand* 1996, **93**(1):62-68.
186. Fanous A: **Genetic Studies of Schizophrenia and Bipolar Disorder**. *C L I N I C A L S Y N T H E S I S* 2010, **VIII**(3):16.
187. Lichtenstein P, Yip BH, Bjork C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, Hultman CM: **Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study**. *Lancet* 2009, **373**(9659):234-239.
188. Fanous A: **Genetic Studies of Schizophrenia and Bipolar Disorder**. *Focus* 2010, **VIII**(3).
189. Атанасова ИБ, Атанасова СЯ, Балаценко ГН, Богданова НИ, Въжарова РВ, Захариева БМ, Иванова МБ, Илиева ПМ, Йорданова АК, Кременски ИМ *et al*: **Медицинска генетика в клиничната практика**, vol. 1, Първо edn. София: CIELA -Member of the Wolters Kluwer Group; 1999.
190. Cardno AG, Gottesman, II: **Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics**. *Am J Med Genet* 2000, **97**(1):12-17.
191. Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK: **Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia**. *Arch Gen Psychiatry* 1994, **51**(6):456-468.
192. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D: **Principles of Medical Genetics**, vol. 1, Second edn. Pennsylvania: Williams & Wilkins; 1998.

193. **Genetic Studies of Schizophrenia and Bipolar Disorder**. *Focus* 2010, **8**(3):323-338.
194. Riley BP, McGuffin P: **Linkage and associated studies of schizophrenia**. *Am J Med Genet* 2000, **97**(1):23-44.
195. Risch N: **Genetic linkage and complex diseases, with special reference to psychiatric disorders**. *Genet Epidemiol* 1990, **7**(1):3-16; discussion 17-45.
196. McQueen MB, Devlin B, Faraone SV, Nimgaonkar VL, Sklar P, Smoller JW, Abou Jamra R, Albus M, Bacanu SA, Baron M *et al*: **Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q**. *Am J Hum Genet* 2005, **77**(4):582-595.
197. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV *et al*: **Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia**. *Am J Hum Genet* 2003, **73**(1):34-48.
198. Risch N, Merikangas K: **The future of genetic studies of complex human diseases**. *Science* 1996, **273**(5281):1516-1517.
199. Costas J, Torres M, Cristobo I, Phillips C, Carracedo A: **Relative efficiency of the linkage disequilibrium mapping approach in detecting candidate genes for schizophrenia in different European populations**. *Genomics* 2005, **86**(3):280-286.
200. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L: **Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database**. *Nat Genet* 2008, **40**(7):827-834.
201. Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B *et al*: **Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia**. *Am J Hum Genet* 2002, **71**(2):337-348.
202. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT *et al*: **Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia**. *Am J Hum Genet* 2002, **71**(4):877-892.
203. Maher BS, Reimers MA, Riley BP, Kendler KS: **Allelic heterogeneity in genetic association meta-analysis: an application to DTNBP1 and schizophrenia**. *Hum Hered* 2010, **69**(2):71-79.
204. Munafo MR, Attwood AS, Flint J: **Neuregulin 1 genotype and schizophrenia**. *Schizophr Bull* 2008, **34**(1):9-12.
205. Talkowski ME, Seltman H, Bassett AS, Brzustowicz LM, Chen X, Chowdari KV, Collier DA, Cordeiro Q, Corvin AP, Deshpande SN *et al*: **Evaluation of a susceptibility gene for schizophrenia: genotype based meta-analysis of RGS4 polymorphisms from thirteen independent samples**. *Biol Psychiatry* 2006, **60**(2):152-162.
206. Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ: **G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis**. *Biol Psychiatry* 2006, **60**(2):106-114.
207. Schumacher J, Laje G, Abou Jamra R, Becker T, Muhleisen TW, Vasilescu C, Mattheisen M, Herms S, Hoffmann P, Hillmer AM *et al*: **The DISC locus and schizophrenia: evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations**. *Hum Mol Genet* 2009, **18**(14):2719-2727.
208. Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, Lonnqvist J, Peltonen L: **Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(11):1037-1041.
209. Macgregor S, Visscher PM, Knott SA, Thomson P, Porteous DJ, Millar JK, Devon RS, Blackwood D, Muir WJ: **A genome scan and follow-up study identify a bipolar disorder susceptibility locus on chromosome 1q42**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(12):1083-1090.
210. Camargo LM, Wang Q, Brandon NJ: **What can we learn from the disrupted in schizophrenia 1 interactome: lessons for target identification and disease biology?** *Novartis Found Symp* 2008, **289**:208-216; discussion 216-221, 238-240.
211. Ayhan Y, Abazyan B, Nomura J, Kim R, Ladenheim B, Krasnova IN, Sawa A, Margolis RL, Cadet JL, Mori S *et al*: **Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for**

neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2011, **16**(3):293-306.

212. Pletnikov MV, Ayhan Y, Nikolskaia O, Xu Y, Ovanesov MV, Huang H, Mori S, Moran TH, Ross CA: **Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2008, **13**(2):173-186, 115.
213. Thiselton DL, Vladimirov VI, Kuo PH, McClay J, Wormley B, Fanous A, O'Neill FA, Walsh D, Van den Oord EJ, Kendler KS *et al*: **AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families**. *Biol Psychiatry* 2008, **63**(5):449-457.
214. Chen X, Wang X, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS: **Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(10):962-967.
215. Schwab SG, Wildenauer DB: **Update on key previously proposed candidate genes for schizophrenia**. *Curr Opin Psychiatry* 2009, **22**(2):147-153.
216. Gogos JA, Gerber DJ: **Schizophrenia susceptibility genes: emergence of positional candidates and future directions**. *Trends Pharmacol Sci* 2006, **27**(4):226-233.
217. Harrison PJ, Weinberger DR: **Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence**. *Mol Psychiatry* 2005, **10**(1):40-68; image 45.
218. Hennah W, Varilo T, Kestila M, Paunio T, Arajarvi R, Haukka J, Parker A, Martin R, Levitzky S, Partonen T *et al*: **Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects**. *Hum Mol Genet* 2003, **12**(23):3151-3159.
219. Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK: **Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder**. *Am J Hum Genet* 2004, **75**(5):862-872.
220. Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C *et al*: **Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population**. *Am J Hum Genet* 2003, **72**(1):83-87.
221. Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Zammit S, O'Donovan MC, Owen MJ: **Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2003, **8**(5):485-487.
222. Corvin AP, Morris DW, McGhee K, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Clair DS, Waddington JL, Gill M: **Confirmation and refinement of an 'at-risk' haplotype for schizophrenia suggests the EST cluster, Hs.97362, as a potential susceptibility gene at the Neuregulin-1 locus**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(2):208-213.
223. Tang JX, Chen WY, He G, Zhou J, Gu NF, Feng GY, He L: **Polymorphisms within 5' end of the Neuregulin 1 gene are genetically associated with schizophrenia in the Chinese population**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(1):11-12.
224. Yang JZ, Si TM, Ruan Y, Ling YS, Han YH, Wang XL, Zhou M, Zhang HY, Kong QM, Liu C *et al*: **Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2003, **8**(7):706-709.
225. Zhao X, Shi Y, Tang J, Tang R, Yu L, Gu N, Feng G, Zhu S, Liu H, Xing Y *et al*: **A case control and family based association study of the neuregulin1 gene and schizophrenia**. *J Med Genet* 2004, **41**(1):31-34.
226. Li T, Stefansson H, Gudfinnsson E, Cai G, Liu X, Murray RM, Steinthorsdottir V, Januel D, Gudnadottir VG, Petursson H *et al*: **Identification of a novel neuregulin 1 at-risk haplotype in Han schizophrenia Chinese patients, but no association with the Icelandic/Scottish risk haplotype**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(7):698-704.
227. Kirov G, Ivanov D, Williams NM, Preece A, Nikolov I, Milev R, Koleva S, Dimitrova A, Toncheva D, O'Donovan MC *et al*: **Strong evidence for association between the dystrobrevin binding**

protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. *Biol Psychiatry* 2004, **55**(10):971-975.
228. Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W *et al*: **Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families**. *Am J Hum Genet* 2003, **72**(1):185-190.
229. Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, Norton N, Williams H, Clement M, Dwyer S *et al*: **Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1)**. *Arch Gen Psychiatry* 2004, **61**(4):336-344.
230. Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P: **Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2001, **6**(3):293-301.
231. Morris DW, Rodgers A, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP: **Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004, **125B**(1):50-53.
232. Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B KT, Ferrell RE, Middleton FA *et al*: **Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia**. *Hum Mol Genet* 2002, **11**(12):1373-1380.
233. Huffaker SJ, Chen J, Nicodemus KK, Sambataro F, Yang F, Mattay V, Lipska BK, Hyde TM, Song J, Rujescu D *et al*: **A primate-specific, brain isoform of KCNH2 affects cortical physiology, cognition, neuronal repolarization and risk of schizophrenia**. *Nat Med* 2009, **15**(5):509-518.
234. Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L *et al*: **A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia**. *Am J Hum Genet* 2002, **71**(6):1296-1302.
235. Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT: **Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies**. *Am J Psychiatry* 2003, **160**(3):469-476.
236. Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA: **Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia**. *Nat Genet* 2004, **36**(2):131-137.
237. Schwab SG, Hoefgen B, Hanses C, Hassenbach MB, Albus M, Lerer B, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB: **Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families**. *Biol Psychiatry* 2005, **58**(6):446-450.
238. Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT: **Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2003, **8**(11):911-915.
239. Jonsson EG, Sillen A, Vares M, Ekholm B, Terenius L, Sedvall GC: **Dopamine D2 receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003, **119B**(1):28-34.
240. Arranz MJ, de Leon J: **Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research**. *Mol Psychiatry* 2007, **12**(8):707-747.
241. Schindler KM, Pato MT, Dourado A, Macedo A, Azevedo MH, Kennedy JL, Pato CN: **Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population**. *Mol Psychiatry* 2002, **7**(9):1002-1005.
242. European Multicentre Association Study of Schizophrenia G, Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Owen MJ, Mallet J, N?then MM, Gill M, Aschauer H, Nylander PO *et al*: **Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene**. *The Lancet* 1996, **347**(9011):1294-1296.
243. Vereczkei A, Mirnics K: **Genetic predisposition to schizophrenia: what did we learn and what does the future hold?** *Neuropsychopharmacol Hung* 2011, **13**(4):205-210.
244. Petretto E, Liu ET, Aitman TJ: **A gene harvest revealing the archeology and complexity of human disease**. *Nat Genet* 2007, **39**(11):1299-1301.

245. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT: **Neurobiology of schizophrenia**. *Neuron* 2006, **52**(1):139-153.
246. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P: **Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder**. *Nature* 2009, **460**(7256):748-752.
247. Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ *et al*: **Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia**. *Nature* 2009, **460**(7256):753-757.
248. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietilainen OP, Mors O, Mortensen PB *et al*: **Common variants conferring risk of schizophrenia**. *Nature* 2009, **460**(7256):744-747.
249. Sullivan PF, Lin D, Tzeng JY, van den Oord E, Perkins D, Stroup TS, Wagner M, Lee S, Wright FA, Zou F *et al*: **Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1**. *Mol Psychiatry* 2008, **13**(6):570-584.
250. Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK: **Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2007, **12**(6):572-580.
251. Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperaviciute D, Gennarelli M *et al*: **A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia**. *PLoS Genet* 2009, **5**(2):e1000373.
252. O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L *et al*: **Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up**. *Nat Genet* 2008, **40**(9):1053-1055.
253. Steinberg S, Mors O, Borglum AD, Gustafsson O, Werge T, Mortensen PB, Andreassen OA, Sigurdsson E, Thorgeirsson TE, Bottcher Y *et al*: **Expanding the range of ZNF804A variants conferring risk of psychosis**. *Mol Psychiatry* 2011, **16**(1):59-66.
254. Williams HJ, Norton N, Dwyer S, Moskvina V, Nikolov I, Carroll L, Georgieva L, Williams NM, Morris DW, Quinn EM *et al*: **Fine mapping of ZNF804A and genome-wide significant evidence for its involvement in schizophrenia and bipolar disorder**. *Mol Psychiatry* 2011, **16**(4):429-441.
255. Riley B, Thiselton D, Maher BS, Bigdeli T, Wormley B, McMichael GO, Fanous AH, Vladimirov V, O'Neill FA, Walsh D *et al*: **Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample**. *Mol Psychiatry* 2010, **15**(1):29-37.
256. Zhang F, Chen Q, Ye T, Lipska BK, Straub RE, Vakkalanka R, Rujescu D, St Clair D, Hyde TM, Bigelow L *et al*: **Evidence of sex-modulated association of ZNF804A with schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 2011, **69**(10):914-917.
257. Harrison PJ, Owen MJ: **Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications**. *Lancet* 2003, **361**(9355):417-419.
258. Lee KW, Woon PS, Teo YY, Sim K: **Genome wide association studies (GWAS) and copy number variation (CNV) studies of the major psychoses: What have we learnt?** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2012, **36**(1):556-571.
259. Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA: **Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle?** *Current Opinion in Genetics & Development* 2011, **21**(3):310-316.
260. Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, Hillmer A, Toncheva D, Owen MJ, O'Donovan MC: **A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling**. *Mol Psychiatry* 2008, **14**(8):796-803.
261. Sebat J: **Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking**. *Nat Genet* 2007, **39**(7 Suppl):S3-5.
262. MacIntyre DJ, Blackwood DH, Porteous DJ, Pickard BS, Muir WJ: **Chromosomal abnormalities and mental illness**. *Mol Psychiatry* 2003, **8**(3):275-287.
263. Flint J, Munafo MR: **The endophenotype concept in psychiatric genetics**. *Psychol Med* 2007, **37**(2):163-180.

264. Kirov G, Gumus D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, O'Donovan MC, Erdogan F, Owen MJ, Ropers HH *et al*: **Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia**. *Hum Mol Genet* 2008, **17**(3):458-465.
265. Kirov G, Grozeva D, Norton N, Ivanov D, Mantripragada KK, Holmans P, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC: **Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia**. *Hum Mol Genet* 2009, **18**(8):1497-1503.
266. McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O *et al*: **Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia**. *Nat Genet* 2009, **41**(11):1223-1227.
267. Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietilainen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE *et al*: **Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia**. *Nature* 2008, **455**(7210):232-236.
268. Pritchard JK: **Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(1):124-137.
269. Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ: **Phenotypic and genetic complexity of psychosis. Invited commentary on ... Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles**. *Br J Psychiatry* 2007, **190**:200-203.
270. Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D *et al*: **Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes**. *N Engl J Med* 2008, **359**(16):1685-1699.
271. **Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia**. *Nature* 2008, **455**(7210):237-241.
272. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, Schroer RJ, Novara F, De Gregori M, Ciccone R *et al*: **A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures**. *Nat Genet* 2008, **40**(3):322-328.
273. Veltman MW, Craig EE, Bolton PF: **Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: a systematic review**. *Psychiatr Genet* 2005, **15**(4):243-254.
274. Cassidy SB, Dykens E, Williams CA: **Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders**. *Am J Med Genet* 2000, **97**(2):136-146.
275. Antshel KM, Aneja A, Strunge L, Peebles J, Fremont WP, Stallone K, Abdulsabur N, Higgins AM, Shprintzen RJ, Kates WR: **Autistic spectrum disorders in velo-cardio facial syndrome (22q11.2 deletion)**. *J Autism Dev Disord* 2007, **37**(9):1776-1786.
276. Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC: **The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13**. *Neurobiol Dis* 2010, **38**(2):181-191.
277. Nishimura Y, Martin CL, Vazquez-Lopez A, Spence SJ, Alvarez-Retuerto AI, Sigman M, Steindler C, Pellegrini S, Schanen NC, Warren ST *et al*: **Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways**. *Hum Mol Genet* 2007, **16**(14):1682-1698.
278. Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietilainen OP, Barnes MR, Toulopoulou T, Picchioni M, Vassos E, Ettinger U, Bramon E *et al*: **Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia**. *Hum Mol Genet* 2009, **18**(5):988-996.
279. Ingason A, Rujescu D, Cichon S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Pietilainen OP, Buizer-Voskamp JE, Strengman E, Francks C, Muglia P *et al*: **Copy number variations of chromosome 16p13.1 region associated with schizophrenia**. *Mol Psychiatry* 2011, **16**(1):17-25.
280. Ikeda M, Aleksic B, Kirov G, Kinoshita Y, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kawashima K, Okochi T, Kishi T, Zaharieva I *et al*: **Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population**. *Biol Psychiatry* 2010, **67**(3):283-286.
281. Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A *et al*: **Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia**. *Science* 2008, **320**(5875):539-543.

282. Shi YY, He G, Zhang Z, Tang W, Zhang J, Jr., Zhao Q, Zhang J, Sr., Li XW, Xi ZR, Fang C *et al*: **A study of rare structural variants in schizophrenia patients and normal controls from Chinese Han population**. *Mol Psychiatry* 2008, **13**(10):911-913.
283. Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D, FitzPatrick DR, Maher E, Martin H, Parnau J *et al*: **3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome**. *Am J Hum Genet* 2005, **77**(1):154-160.
284. Bird A: **Perceptions of epigenetics**. *Nature* 2007, **447**(7143):396-398.
285. Stahl S: **Methylated Spirits: Epigenetic Hypotheses of Psychiatric Disorders**. *CNS Spectr* 2010, **15**((4)):220-230.
286. Maric NP, Svrakic DM: **Why schizophrenia genetics needs epigenetics: a review**. *Psychiatr Danub* 2012, **24**(1):2-18.
287. Oh G, Petronis A: **Environmental studies of schizophrenia through the prism of epigenetics**. *Schizophr Bull* 2008, **34**(6):1122-1129.
288. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W: **Epigenetic reprogramming in mammals**. *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No 1**:R47-58.
289. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY: **MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription**. *Science* 2008, **320**(5880):1224-1229.
290. Cohen S, Zhou Z, Greenberg ME: **Medicine. Activating a repressor**. *Science* 2008, **320**(5880):1172-1173.
291. Junier I, Martin O, Kepes F: **Spatial and topological organization of DNA chains induced by gene co-localization**. *PLoS Comput Biol* 2010, **6**(2):e1000678.
292. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR: **Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**(6):437-447.
293. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T: **The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation**. *J Biol Chem* 2003, **278**(6):4035-4040.
294. Szyf M: **Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs**. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009, **49**:243-263.
295. Szyf M, McGowan P, Meaney MJ: **The social environment and the epigenome**. *Environ Mol Mutagen* 2008, **49**(1):46-60.
296. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ: **Epigenetic programming by maternal behavior**. *Nat Neurosci* 2004, **7**(8):847-854.
297. Sweatt JD: **Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system**. *Biol Psychiatry* 2009, **65**(3):191-197.
298. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ: **Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse**. *Nat Neurosci* 2009, **12**(3):342-348.
299. Champagne FA: **Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care**. *Front Neuroendocrinol* 2008, **29**(3):386-397.
300. Lee RJ, Gollan J, Kasckow J, Geracioti T, Coccaro EF: **CSF corticotropin-releasing factor in personality disorder: relationship with self-reported parental care**. *Neuropsychopharmacology* 2006, **31**(10):2289-2295.
301. Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A: **Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [11C]raclopride**. *J Neurosci* 2004, **24**(11):2825-2831.
302. Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M: **Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life**. *J Neurosci* 2005, **25**(47):11045-11054.
303. Nithianantharajah J, Hannan AJ: **Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system**. *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**(9):697-709.

304. Miller CA, Sweatt JD: **Covalent modification of DNA regulates memory formation**. *Neuron* 2007, **53**(6):857-869.
305. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J *et al*: **Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(30):10604-10609.
306. Champagne FA, Curley JP: **Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development**. *Neurosci Biobehav Rev* 2009, **33**(4):593-600.
307. Connor CM, Akbarian S: **DNA methylation changes in schizophrenia and bipolar disorder**. *Epigenetics* 2008, **3**(2):55-58.
308. Waterland RA, Jirtle RL: **Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases**. *Nutrition* 2004, **20**(1):63-68.
309. Hochberg Z: **Developmental plasticity in child growth and maturation**. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011, **2**:41.
310. Cheng XH, H.; Horton, J.R.; Zhang, X.: **Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals.** In: *Handbook of Epigenetics.* Edited by Press A. San Diego, CA, USA: Trygve, T.; 2011: 9–627.
311. Tran K, Gralla JD: **Control of the timing of promoter escape and RNA catalysis by the transcription factor IIb fingertip**. *J Biol Chem* 2008, **283**(23):15665-15671.
312. Carrera I, Treisman JE: **Message in a nucleus: signaling to the transcriptional machinery**. *Curr Opin Genet Dev* 2008, **18**(5):397-403.
313. Golbabapour S, Abdulla MA, Hajrezaei M: **A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms**. *Int J Mol Sci* 2011, **12**(12):8661-8694.
314. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS: **Non-coding RNAs: regulators of disease**. *J Pathol* 2010, **220**(2):126-139.
315. Bonasio R, Tu S, Reinberg D: **Molecular signals of epigenetic states**. *Science* 2010, **330**(6004):612-616.
316. Cedar H, Bergman Y: **Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms**. *Nat Rev Genet* 2009, **10**(5):295-304.
317. Hanley B, Dijane J, Fewtrell M, Grynberg A, Hummel S, Junien C, Koletzko B, Lewis S, Renz H, Symonds M *et al*: **Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities**. *Br J Nutr* 2010, **104 Suppl 1**:S1-25.
318. Cheng XH, H.; Horton, J.R.; Zhang, X.: **Mechanisms of DNA Methylation, Methyl-CpG Recognition, and Demethylation in Mammals.** In: *Handbook of Epigenetics.* Edited by Trygve T, Ed. San Diego, CA, USA: Academic Press: San Diego, CA, USA; 2011.
319. Hore TA, Rapkins RW, Graves JA: **Construction and evolution of imprinted loci in mammals**. *Trends Genet* 2007, **23**(9):440-448.
320. Yen ZC, Meyer IM, Karalic S, Brown CJ: **A cross-species comparison of X-chromosome inactivation in Eutheria**. *Genomics* 2007, **90**(4):453-463.
321. Miranda TB, Jones PA: **DNA methylation: the nuts and bolts of repression**. *J Cell Physiol* 2007, **213**(2):384-390.
322. Lande-Diner L, Zhang J, Ben-Porath I, Amariglio N, Keshet I, Hecht M, Azuara V, Fisher AG, Rechavi G, Cedar H: **Role of DNA methylation in stable gene repression**. *J Biol Chem* 2007, **282**(16):12194-12200.
323. Hajkova P: **Epigenetic reprogramming--taking a lesson from the embryo**. *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(3):342-350.
324. Fowden AL, Coan PM, Angiolini E, Burton GJ, Constancia M: **Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype**. *Prog Biophys Mol Biol* 2011, **106**(1):281-288.
325. Yamanaka S, Blau HM: **Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches**. *Nature* 2010, **465**(7299):704-712.
326. Schar P, Fritsch O: **DNA repair and the control of DNA methylation**. *Prog Drug Res* 2011, **67**:51-68.

327. Baumann C, Daly CM, McDonnell SM, Viveiros MM, De La Fuente R: **Chromatin configuration and epigenetic landscape at the sex chromosome bivalent during equine spermatogenesis**. *Chromosoma* 2011, **120**(3):227-244.
328. Girton JR, Johansen KM: **Chromatin structure and the regulation of gene expression: the lessons of PEV in Drosophila**. *Adv Genet* 2008, **61**:1-43.
329. Li E: **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development**. *Nat Rev Genet* 2002, **3**(9):662-673.
330. Simon JA, Kingston RE: **Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(10):697-708.
331. Shiota K: **DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals**. *Cytogenet Genome Res* 2004, **105**(2-4):325-334.
332. Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S: **Epigenetic mechanisms in mammals**. *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**(4):596-612.
333. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z: **Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing**. *Mutat Res* 2008, **659**(1-2):40-48.
334. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R: **Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues**. *Cell* 2010, **143**(4):508-525.
335. Reik W, Dean W, Walter J: **Epigenetic reprogramming in mammalian development**. *Science* 2001, **293**(5532):1089-1093.
336. Bird AP: **CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus**. *Trends in Genetics* 1987, **3**(0):342-347.
337. Antequera F, Bird A: **Number of CpG islands and genes in human and mouse**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(24):11995-11999.
338. Saxonov S: **A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**(5):1412–1417.
339. Fatemi M: **Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level**. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(20):e176.
340. Takai D: **Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**(6):3740–3745.
341. Cruz GBGoUS: **UCSC Genome Browser**. In.: Genome Reference Consortium; 2009.
342. Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS: **Imprinting and epigenetic changes in the early embryo**. *Mamm Genome* 2009, **20**(9-10):532-543.
343. Ooi SK, O'Donnell AH, Bestor TH: **Mammalian cytosine methylation at a glance**. *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 16):2787-2791.
344. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD: **DNA methylation in development and human disease**. *Mutat Res* 2008, **647**(1-2):30-38.
345. Chang H, Zhang T, Zhang Z, Bao R, Fu C, Wang Z, Bao Y, Li Y, Wu L, Zheng X *et al*: **Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects**. *J Nutr Biochem* 2011, **22**(12):1172-1177.
346. Howlett SK, Reik W: **Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development**. *Development* 1991, **113**(1):119-127.
347. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T: **Demethylation of the zygotic paternal genome**. *Nature* 2000, **403**(6769):501-502.
348. Curchoe CL, Zhang S, Yang L, Page R, Tian XC: **Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle**. *Anim Reprod Sci* 2009, **116**(3-4):213-225.
349. Kang YK, Lee KK, Han YM: **Reprogramming DNA methylation in the preimplantation stage: peeping with Dolly's eyes**. *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(3):290-295.
350. Jones PA, Takai D: **The role of DNA methylation in mammalian epigenetics**. *Science* 2001, **293**(5532):1068-1070.

351. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM *et al*: **Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences**. *Nature* 2009, **462**(7271):315-322.
352. Holmes R, Soloway PD: **Regulation of imprinted DNA methylation**. *Cytogenet Genome Res* 2006, **113**(1-4):122-129.
353. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W: **Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo**. *Dev Biol* 2002, **241**(1):172-182.
354. Gebert C, Wrenzycki C, Herrmann D, Groger D, Thiel J, Reinhardt R, Lehrach H, Hajkova P, Lucas-Hahn A, Carnwath JW *et al*: **DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning**. *Genomics* 2009, **94**(1):63-69.
355. Horsthemke B, Buiting K: **Chapter 8 Genomic Imprinting and Imprinting Defects in Humans**. In: *Advances in Genetics.* Edited by Veronica van H, Robert EH, vol. Volume 61: Academic Press; 2008: 225-246.
356. Wei Y, Zhu J, Huan Y, Liu Z, Yang C, Zhang X, Mu Y, Xia P: **Aberrant expression and methylation status of putatively imprinted genes in placenta of cloned piglets**. *Cell Reprogram* 2010, **12**(2):213-222.
357. Estecio MR, Issa JP: **Dissecting DNA hypermethylation in cancer**. *FEBS Lett* 2011, **585**(13):2078-2086.
358. Acevedo LG, Sanz A, Jelinek MA: **Novel DNA binding domain-based assays for detection of methylated and nonmethylated DNA**. *Epigenomics* 2011, **3**(1):93-101.
359. Laird PW: **Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis**. *Nat Rev Genet* 2010, **11**(3):191-203.
360. Razin A, Cedar H: **DNA methylation and embryogenesis**. *EXS* 1993, **64**:343-357.
361. Razin A, Kantor B: **DNA methylation in epigenetic control of gene expression**. *Prog Mol Subcell Biol* 2005, **38**:151-167.
362. Chen T, Li E: **Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases**. *Curr Top Dev Biol* 2004, **60**:55-89.
363. Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G: **Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons**. *Nat Neurosci* 2010, **13**(4):423-430.
364. Schaefer M, Lyko F: **Solving the Dnmt2 enigma**. *Chromosoma* 2010, **119**(1):35-40.
365. Chedin F: **The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases**. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011, **101**:255-285.
366. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A: **Structure and function of mammalian DNA methyltransferases**. *Chembiochem* 2011, **12**(2):206-222.
367. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: **DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development**. *Cell* 1999, **99**(3):247-257.
368. Sakai Y, Suetake I, Shinozaki F, Yamashina S, Tajima S: **Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos**. *Gene Expr Patterns* 2004, **5**(2):231-237.
369. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S: **DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction**. *J Biol Chem* 2004, **279**(26):27816-27823.
370. Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G *et al*: **Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter**. *Nature* 2008, **452**(7183):45-50.
371. Ng HK, Novakovic B, Hiendleder S, Craig JM, Roberts CT, Saffery R: **Distinct patterns of gene-specific methylation in mammalian placentas: implications for placental evolution and function**. *Placenta* 2010, **31**(4):259-268.
372. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Shan J, Su Z, Fields CR, Vieweg J, Hamazaki T, Schwartz PH, Terada N, Robertson KD: **A novel DNMT3B splice variant expressed in tumor and**

pluripotent cells modulates genomic DNA methylation patterns and displays altered DNA binding. *Mol Cancer Res* 2009, **7**(10):1622-1634.

373. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu J, Muthusamy N *et al*: **MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1**. *Blood* 2009, **113**(25):6411-6418.
374. Hata K, Okano M, Lei H, Li E: **Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice**. *Development* 2002, **129**(8):1983-1993.
375. Girod PA, Nguyen DQ, Calabrese D, Puttini S, Grandjean M, Martinet D, Regamey A, Saugy D, Beckmann JS, Bucher P *et al*: **Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells**. *Nat Methods* 2007, **4**(9):747-753.
376. Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE: **De novo CpG island methylation in human cancer cells**. *Cancer Res* 2006, **66**(2):682-692.
377. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X: **Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation**. *Nature* 2007, **449**(7159):248-251.
378. Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD *et al*: **DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA**. *Nature* 2007, **448**(7154):714-717.
379. Ferguson-Smith AC, Greally JM: **Epigenetics: perceptive enzymes**. *Nature* 2007, **449**(7159):148-149.
380. Zhang Y, Rohde C, Tierling S, Jurkowski TP, Bock C, Santacruz D, Ragozin S, Reinhardt R, Groth M, Walter J *et al*: **DNA methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution**. *PLoS Genet* 2009, **5**(3):e1000438.
381. Ooi SK, Bestor TH: **The colorful history of active DNA demethylation**. *Cell* 2008, **133**(7):1145-1148.
382. Hattori N, Imao Y, Nishino K, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K: **Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells**. *Genes Cells* 2007, **12**(3):387-396.
383. Simonsson S, Gurdon J: **DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei**. *Nat Cell Biol* 2004, **6**(10):984-990.
384. Fraga MF, Agrelo R, Esteller M: **Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language**. *Ann N Y Acad Sci* 2007, **1100**:60-74.
385. Esteller M: **Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps**. *Nat Rev Genet* 2007, **8**(4):286-298.
386. Sharma S, Kelly TK, Jones PA: **Epigenetics in cancer**. *Carcinogenesis* 2010, **31**(1):27-36.
387. Paluszczak J, Baer-Dubowska W: **Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers**. *J Appl Genet* 2006, **47**(4):365-375.
388. Verma M, Manne U: **Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations**. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, **60**(1):9-18.
389. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R: **Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation**. *Science* 2003, **300**(5618):489-492.
390. Costa FF, Paixao VA, Cavalher FP, Ribeiro KB, Cunha IW, Rinck JA, Jr., O'Hare M, Mackay A, Soares FA, Brentani RR *et al*: **SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer**. *Cancer Genet Cytogenet* 2006, **165**(2):135-143.
391. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP: **Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms**. *Science* 1985, **228**(4696):187-190.
392. Futscher BW, O'Meara MM, Kim CJ, Rennels MA, Lu D, Gruman LM, Seftor RE, Hendrix MJ, Domann FE: **Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer**. *Neoplasia* 2004, **6**(4):380-389.

393. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE: **Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression**. *Nat Genet* 2002, **31**(2):175-179.
394. Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rummele P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstadter F, Dietmaier W: **Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer**. *J Pathol* 2005, **205**(5):606-614.
395. Wilson AS, Power BE, Molloy PL: **DNA hypomethylation and human diseases**. *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**(1):138-162.
396. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M *et al*: **The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores**. *Nat Genet* 2009, **41**(2):178-186.
397. Ito Y, Koessler T, Ibrahim AE, Rai S, Vowler SL, Abu-Amero S, Silva AL, Maia AT, Huddleston JE, Uribe-Lewis S *et al*: **Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer**. *Hum Mol Genet* 2008, **17**(17):2633-2643.
398. Esteller M: **Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome**. *Hum Mol Genet* 2007, **16 Spec No 1**:R50-59.
399. Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H *et al*: **Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples**. *Nat Biotechnol* 2009, **27**(9):858-863.
400. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA: **Epigenetic modifications as therapeutic targets**. *Nat Biotech* 2010, **28**(10):1069-1078.
401. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S *et al*: **Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts**. *Nat Genet* 2009, **41**(12):1350-1353.
402. Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K *et al*: **Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors**. *Nature* 2010, **467**(7313):338-342.
403. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C *et al*: **Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor**. *Science* 2002, **295**(5557):1079-1082.
404. Frigola J, Song J, Stirzaker C, Hinshelwood RA, Peinado MA, Clark SJ: **Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band**. *Nat Genet* 2006, **38**(5):540-549.
405. Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C: **Cancer genetics of epigenetic genes**. *Hum Mol Genet* 2007, **16 Spec No 1**:R28-49.
406. Zhu J, Yao X: **Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification**. *J Biochem Mol Biol* 2007, **40**(2):135-141.
407. Plass C, Byrd JC, Raval A, Tanner SM, de la Chapelle A: **Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes**. *Br J Haematol* 2007, **139**(5):744-752.
408. Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G: **Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia**. *Leukemia* 2008, **22**(8):1529-1538.
409. Carraway HE, Wang S, Blackford A, Guo M, Powers P, Jeter S, Davidson NE, Argani P, Terrell K, Herman JG *et al*: **Promoter hypermethylation in sentinel lymph nodes as a marker for breast cancer recurrence**. *Breast Cancer Res Treat* 2009, **114**(2):315-325.
410. Ordway JM, Budiman MA, Korshunova Y, Maloney RK, Bedell JA, Citek RW, Bacher B, Peterson S, Rohlfing T, Hall J *et al*: **Identification of novel high-frequency DNA methylation changes in breast cancer**. *PLoS One* 2007, **2**(12):e1314.

411. Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai SL, Arepalli S, Dillman A, Rafferty IP, Troncoso J *et al*: **Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain**. *PLoS Genet* 2010, **6**(5):e1000952.
412. Wynder C, Hakimi MA, Epstein JA, Shilatifard A, Shiekhattar R: **Recruitment of MLL by HMG-domain protein iBRAF promotes neural differentiation**. *Nat Cell Biol* 2005, **7**(11):1113-1117.
413. Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR: **MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development**. *Nature* 2009, **460**(7255):642-646.
414. Graff J, Mansuy IM: **Epigenetic codes in cognition and behaviour**. *Behav Brain Res* 2008, **192**(1):70-87.
415. Ogier M, Katz DM: **Breathing dysfunction in Rett syndrome: understanding epigenetic regulation of the respiratory network**. *Respir Physiol Neurobiol* 2008, **164**(1-2):55-63.
416. Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M: **Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies**. *Lancet Neurol* 2009, **8**(11):1056-1072.
417. Hite KC, Adams VH, Hansen JC: **Recent advances in MeCP2 structure and function**. *Biochem Cell Biol* 2009, **87**(1):219-227.
418. Urdinguio RG, Lopez-Serra L, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Diaz-Uriarte R, Fernandez AF, Esteller M: **Mecp2-null mice provide new neuronal targets for Rett syndrome**. *PLoS One* 2008, **3**(11):e3669.
419. Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I: **MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization**. *Hum Mol Genet* 2008, **17**(8):1192-1199.
420. Urdinguio RG, Fernandez AF, Lopez-Nieva P, Rossi S, Huertas D, Kulis M, Liu CG, Croce CM, Calin GA, Esteller M: **Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome**. *Epigenetics* 2010, **5**(7):656-663.
421. Gheldof N, Tabuchi TM, Dekker J: **The active FMR1 promoter is associated with a large domain of altered chromatin conformation with embedded local histone modifications**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(33):12463-12468.
422. Lahiri DK, Maloney B, Basha MR, Ge YW, Zawia NH: **How and when environmental agents and dietary factors affect the course of Alzheimer's disease: the "LEARn" model (latent early-life associated regulation) may explain the triggering of AD**. *Curr Alzheimer Res* 2007, **4**(2):219-228.
423. Pieper HC, Evert BO, Kaut O, Riederer PF, Waha A, Wullner U: **Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability**. *Neurobiol Dis* 2008, **32**(3):521-527.
424. Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OF, Spengler D: **Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress**. *Nat Neurosci* 2009, **12**(12):1559-1566.
425. Robertson KD: **DNA methylation and human disease**. *Nat Rev Genet* 2005, **6**(8):597-610.
426. De Sario A: **Clinical and molecular overview of inherited disorders resulting from epigenomic dysregulation**. *Eur J Med Genet* 2009, **52**(6):363-372.
427. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N: **MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1**. *J Immunol* 2010, **184**(12):6773-6781.
428. Millington GW: **Epigenetics and dermatological disease**. *Pharmacogenomics* 2008, **9**(12):1835-1850.
429. Zhou Y, Lu Q: **DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients**. *Autoimmun Rev* 2008, **7**(5):376-383.
430. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG *et al*: **Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus**. *Genome Res* 2010, **20**(2):170-179.

431. Javierre BM, Esteller M, Ballestar E: **Epigenetic connections between autoimmune disorders and haematological malignancies**. *Trends Immunol* 2008, **29**(12):616-623.
432. Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M: **Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts**. *Nat Rev Rheumatol* 2009, **5**(5):266-272.
433. Luo Y, Li Y, Su Y, Yin H, Hu N, Wang S, Lu Q: **Abnormal DNA methylation in T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus**. *Br J Dermatol* 2008, **159**(4):827-833.
434. Turunen MP, Aavik E, Yla-Herttuala S: **Epigenetics and atherosclerosis**. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**(9):886-891.
435. Wojdacz TK, Dobrovic A, Algar EM: **Rapid detection of methylation change at H19 in human imprinting disorders using methylation-sensitive high-resolution melting**. *Hum Mutat* 2008, **29**(10):1255-1260.
436. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP *et al*: **Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57**. *Nat Genet* 2008, **40**(8):949-951.
437. Hosoki K, Ogata T, Kagami M, Tanaka T, Saitoh S: **Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype**. *Eur J Hum Genet* 2008, **16**(8):1019-1023.
438. Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, Jia P, Assadzadeh A, Flanagan J, Schumacher A *et al*: **Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis**. *Am J Hum Genet* 2008, **82**(3):696-711.
439. Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, Kalidindi S, Picchioni M, Kravariti E, Toulopoulou T *et al*: **Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder**. *Hum Mol Genet* 2011, **20**(24):4786-4796.
440. Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A: **REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome**. *Mol Interv* 2002, **2**(1):47-57.
441. Huang HS, Akbarian S: **GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia**. *PLoS One* 2007, **2**(8):e809.
442. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R *et al*: **Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study**. *Arch Gen Psychiatry* 2000, **57**(11):1061-1069.
443. Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR: **On the epigenetic regulation of the human reelin promoter**. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(13):2930-2939.
444. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, Shafa R, Glatt SJ, Nguyen G, Ponte JF *et al*: **Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report**. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005, **134B**(1):60-66.
445. Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E: **Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(26):9341-9346.
446. Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB, Mitchell CP, Sugaya I, Tueting P, Sharma R, Grayson DR, Costa E, Guidotti A: **An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(26):17095-17100.
447. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N, Kato T: **Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients**. *Biol Psychiatry* 2008, **63**(5):530-533.
448. Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H: **Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders**. *Mol Psychiatry* 2007, **12**(6):519, 593-600.

449. Chen Y, Dong E, Grayson DR: **Analysis of the GAD1 promoter: trans-acting factors and DNA methylation converge on the 5' untranslated region**. *Neuropharmacology* 2011, **60**(7-8):1075-1087.
450. Veldic M, Guidotti A, Maloku E, Davis JM, Costa E: **In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(6):2152-2157.
451. Zhubi A, Veldic M, Puri NV, Kadriu B, Caruncho H, Loza I, Sershen H, Lajtha A, Smith RC, Guidotti A *et al*: **An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes**. *Schizophr Res* 2009, **111**(1-3):115-122.
452. Bromberg A, Levine J, Nemetz B, Belmaker RH, Agam G: **No association between global leukocyte DNA methylation and homocysteine levels in schizophrenia patients**. *Schizophr Res* 2008, **101**(1-3):50-57.
453. Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A, Tsujita T, Fuke C, Umekage T, Tochigi M, Hiramatsu K, Miyazaki T, Oda T *et al*: **Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia**. *J Psychiatr Res* 2007, **41**(12):1042-1046.
454. Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H: **GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes**. *Biol Psychiatry* 2008, **64**(8):645-652.
455. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Miller DM, Chaires JB: **Interrogation of the plasma proteome with differential scanning calorimetry**. *Clin Chem* 2007, **53**(11):2012-2014.
456. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB: **Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome**. *Biophys J* 2008, **94**(4):1377-1383.
457. Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, Jenson AB, Chaires JB: **Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring**. *Exp Mol Pathol* 2009, **86**(3):186-191.
458. Michnik A: **Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease**. *J Therm Anal Calorim* 2010, **102**:57-60.
459. Michnik A, Drzazga Z, Michalik K, Barczyk A, Santura I, Sozańska E, Pierzchała W: **Differential scanning calorimetry study of blood serum in chronic obstructive pulmonary disease**. *J Therm Anal Calorim* 2010, **102**(1):57-60.
460. Zapf I, Fekecs T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Lőrinczy D: **DSC analysis of human plasma in breast cancer patients**. *Thermochimica Acta* 2011, **524**(1–2):88-91.
461. Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D: **Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases**. *J Therm Anal Calorim* 2012, **108**(1):149-152.
462. D. Xiang NCG, J. B. Chaires, G. H. Kloecker: **Differential scanning calorimetry of blood plasma for lung cancer diagnosis.** *J Clin Oncol* 2010.
463. Todinova S, Krumova S, Gartcheva L, Robeerst C, Taneva SG: **Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case**. *Anal Chem* 2011, **83**(20):7992-7998.
464. Novak P, Jensen T, Oshiro MM, Wozniak RJ, Nouzova M, Watts GS, Klimecki WT, Kim C, Futscher BW: **Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer**. *Cancer Res* 2006, **66**(22):10664-10670.
465. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D: **Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells**. *Nat Genet* 2005, **37**(8):853-862.
466. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S, Rand E, Hecht M, Segal E, Pikarski E, Young RA, Niveleau A, Cedar H *et al*: **Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells**. *Nat Genet* 2006, **38**(2):149-153.
467. Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP: **Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a**

microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(13):5527-5532.

468. Yan PS, Perry MR, Laux DE, Asare AL, Caldwell CW, Huang TH: **CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer**. *Clin Cancer Res* 2000, **6**(4):1432-1438.
469. Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, Komatsubara H, Mukai T: **A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991, **88**(21):9523-9527.
470. Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A *et al*: **DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project**. *PLoS Biol* 2004, **2**(12):e405.
471. Gitan RS, Shi H, Chen CM, Yan PS, Huang TH: **Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis**. *Genome Res* 2002, **12**(1):158-164.
472. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R: **Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis**. *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(18):5868-5877.
473. Adorjan P, Distler J, Lipscher E, Model F, Muller J, Pelet C, Braun A, Florl AR, Gutig D, Grabs G *et al*: **Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis**. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(5):e21.
474. Dai Z, Weichenhan D, Wu YZ, Hall JL, Rush LJ, Smith LT, Raval A, Yu L, Kroll D, Muehlisch J *et al*: **An AscI boundary library for the studies of genetic and epigenetic alterations in CpG islands**. *Genome Res* 2002, **12**(10):1591-1598.
475. Pomraning KR, Smith KM, Freitag M: **Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes**. *Methods* 2009, **47**(3):142-150.
476. Down TA, Rakyan VK, Turner DJ, Flicek P, Li H, Kulesha E, Graf S, Johnson N, Herrero J, Tomazou EM *et al*: **A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis**. *Nat Biotechnol* 2008, **26**(7):779-785.
477. Jacinto FV, Ballestar E, Esteller M: **Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome**. *Biotechniques* 2008, **44**(1):35, 37, 39 passim.
478. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP: **Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA**. *Nucleic Acids Res* 1992, **20**(19):5085-5092.
479. Wilson IM, Davies JJ, Weber M, Brown CJ, Alvarez CE, MacAulay C, Schubeler D, Lam WL: **Epigenomics: mapping the methylome**. *Cell Cycle* 2006, **5**(2):155-158.
480. Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE *et al*: **Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis**. *Cell* 2006, **126**(6):1189-1201.
481. Siegmund KD: **Statistical approaches for the analysis of DNA methylation microarray data**. *Hum Genet* 2011, **129**(6):585-595.
482. Dahl C, Gronskov K, Larsen LA, Guldberg P, Brondum-Nielsen K: **A homogeneous assay for analysis of FMR1 promoter methylation in patients with fragile X syndrome**. *Clin Chem* 2007, **53**(4):790-793.
483. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ: **Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA**. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(21):4422-4426.
484. Wojdacz TK, Dobrovic A: **Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation**. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(6):e41.
485. Sanchez-Ruiz JM: **Differential scanning calorimetry of proteins**. *Subcell Biochem* 1995, **24**:133-176.

486. Jelesarov I, Bosshard HR: **Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition**. *J Mol Recognit* 1999, **12**(1):3-18.
487. Freire E: **Thermal denaturation methods in the study of protein folding**. *Methods Enzymol* 1995, **259**:144-168.
488. Ryan MT, Chopra RK: **The paradoxical effect of fatty acid on steroid-albumin interaction**. *Biochim Biophys Acta* 1976, **427**(1):337-349.
489. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B: **Understanding and interpreting serum protein electrophoresis**. *Am Fam Physician* 2005, **71**(1):105-112.
490. Fish DJ, Brewood GP, Kim JS, Garbett NC, Chaires JB, Benight AS: **Statistical analysis of plasma thermograms measured by differential scanning calorimetry**. *Biophys Chem* 2010, **152**(1-3):184-190.
491. Jones PA: **Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond**. *Nat Rev Genet* 2012, **13**(7):484-492.
492. Moore LD, Le T, Fan G: **DNA Methylation and Its Basic Function**. *Neuropsychopharmacology* 2013, **38**(1):23-38.
493. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H: **GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs**. *Int Rev Cytol* 2002, **213**:1-47.
494. Liu J, Morgan M, Hutchison K, Calhoun VD: **A study of the influence of sex on genome wide methylation**. *PLoS One* 2010, **5**(4):e10028.
495. Canuso CM, Pandina G: **Gender and schizophrenia**. *Psychopharmacol Bull* 2007, **40**(4):178-190.
496. Bullock WM, Cardon K, Bustillo J, Roberts RC, Perrone-Bizzozero NI: **Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients**. *Am J Psychiatry* 2008, **165**(12):1594-1603.
497. Georgieva L, Moskvina V, Peirce T, Norton N, Bray NJ, Jones L, Holmans P, Macgregor S, Zammit S, Wilkinson J *et al*: **Convergent evidence that oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2) and interacting genes influence susceptibility to schizophrenia**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(33):12469-12474.
498. Betcheva ET, Mushiroda T, Takahashi A, Kubo M, Karachanak SK, Zaharieva IT, Vazharova RV, Dimova, II, Milanova VK, Tolev T *et al*: **Case-control association study of 59 candidate genes reveals the DRD2 SNP rs6277 (C957T) as the only susceptibility factor for schizophrenia in the Bulgarian population**. *J Hum Genet* 2009, **54**(2):98-107.
499. Betcheva ET, Yosifova AG, Mushiroda T, Kubo M, Takahashi A, Karachanak SK, Zaharieva IT, Hadjidekova SP, Dimova, II, Vazharova RV *et al*: **Whole-genome-wide association study in the Bulgarian population reveals HHAT as schizophrenia susceptibility gene**. *Psychiatr Genet* 2013, **23**(1):11-19.
500. Georgieva L, Dimitrova A, Ivanov D, Nikolov I, Williams NM, Grozeva D, Zaharieva I, Toncheva D, Owen MJ, Kirov G *et al*: **Support for neuregulin 1 as a susceptibility gene for bipolar disorder and schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 2008, **64**(5):419-427.
501. Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, Hillmer A, Toncheva D, Owen MJ, O'Donovan MC: **A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling**. *Mol Psychiatry* 2009, **14**(8):796-803.
502. Zaharieva I, Georgieva L, Nikolov I, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC, Toncheva D: **Association study in the 5q31-32 linkage region for schizophrenia using pooled DNA genotyping**. *BMC Psychiatry* 2008, **8**:11.
503. Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T, Kasai K, Iwamoto K: **Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia**. *J Hum Genet* 2013, **58**(2):91-97.
504. Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, Kalidindi S, Picchioni M, Kravariti E, Toulopoulou T *et al*: **Disease-associated epigenetic changes in monozygotic**

twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics* 2011, **20**(24):4786-4796.

505. Melka MG, Laufer BI, McDonald P, Castellani CA, Rajakumar N, O'Reilly R, Singh SM: **The effects of olanzapine on genome-wide DNA methylation in the hippocampus and cerebellum**. *Clin Epigenetics* 2014, **6**(1):1.
506. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T: **Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia**. *Epigenetics* 2013, **8**(6):584-590.
507. Pidsley R, Mill J: **Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research**. *Biol Psychiatry* 2011, **69**(2):146-156.
508. Liu J, Chen J, Ehrlich S, Walton E, White T, Perrone-Bizzozero N, Bustillo J, Turner JA, Calhoun VD: **Methylation Patterns in Whole Blood Correlate With Symptoms in Schizophrenia Patients**. *Schizophrenia Bulletin* 2013.
509. Chen Y, Zhang J, Zhang L, Shen Y, Xu Q: **Effects of MAOA promoter methylation on susceptibility to paranoid schizophrenia**. *Hum Genet* 2012, **131**(7):1081-1087.
510. Melas PA, Rogdaki M, Osby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekstrom TJ: **Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset**. *FASEB J* 2012, **26**(6):2712-2718.
511. Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C *et al*: **DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients**. *Neurosci Res* 2013, **77**(4):208-214.
512. Auta J, Smith RC, Dong E, Tueting P, Sershen H, Boules S, Lajtha A, Davis J, Guidotti A: **DNA-methylation gene network dysregulation in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients**. *Schizophr Res* 2013, **150**(1):312-318.
513. Heijmans BT, Mill J: **Commentary: The seven plagues of epigenetic epidemiology**. *Int J Epidemiol* 2012, **41**(1):74-78.
514. Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C *et al*: **Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood**. *Genome Biol* 2012, **13**(6):R43.
515. Liu J, Chen J, Ehrlich S, Walton E, White T, Perrone-Bizzozero N, Bustillo J, Turner JA, Calhoun VD: **Methylation patterns in whole blood correlate with symptoms in schizophrenia patients**. *Schizophr Bull* 2014, **40**(4):769-776.
516. Wockner LF, Noble EP, Lawford BR, Young RM, Morris CP, Whitehall VL, Voisey J: **Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients**. *Transl Psychiatry* 2014, **4**:e339.
517. Siegmund K: **Statistical approaches for the analysis of DNA methylation microarray data**. *Human Genetics* 2011, **129**(6):585-595.
518. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E *et al*: **High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays**. *Genome Res* 2006, **16**(3):383-393.
519. Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP: **MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells**. *Cancer Res* 2006, **66**(16):7939-7947.
520. Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, Selzer RR, Richmond TA, Zhang X, Dannenberg L *et al*: **High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers**. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(12):3829-3839.
521. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data**. *Biostatistics* 2003, **4**(2):249-264.

522. Nakai T, Kitamura N, Hashimoto T, Kajimoto Y, Nishino N, Mita T, Tanaka C: **Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia**. *Biol Psychiatry* 1991, **30**(4):349-356.
523. Lee ST, Ryu S, Kim SR, Kim MJ, Kim S, Kim JW, Lee SY, Hong KS: **Association study of 27 annotated genes for clozapine pharmacogenetics: validation of preexisting studies and identification of a new candidate gene, ABCB1, for treatment response**. *J Clin Psychopharmacol* 2012, **32**(4):441-448.
524. Vehof J, Risselada AJ, Al Hadithy AF, Burger H, Snieder H, Wilffert B, Arends J, Wunderink L, Knegtering H, Wiersma D *et al*: **Association of genetic variants of the histamine H1 and muscarinic M3 receptors with BMI and HbA1c values in patients on antipsychotic medication**. *Psychopharmacology (Berl)* 2011, **216**(2):257-265.
525. Gaughran F, Payne J, Sedgwick PM, Cotter D, Berry M: **Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder**. *Brain Res Bull* 2006, **70**(3):221-227.
526. Bader V, Tomppo L, Trossbach SV, Bradshaw NJ, Prikulis I, Leliveld SR, Lin CY, Ishizuka K, Sawa A, Ramos A *et al*: **Proteomic, genomic and translational approaches identify CRMP1 for a role in schizophrenia and its underlying traits**. *Hum Mol Genet* 2012, **21**(20):4406-4418.
527. Bornhauser BC, Olsson PA, Lindholm D: **MSAP is a novel MIR-interacting protein that enhances neurite outgrowth and increases myosin regulatory light chain**. *J Biol Chem* 2003, **278**(37):35412-35420.
528. Hamajima N, Matsuda K, Sakata S, Tamaki N, Sasaki M, Nonaka M: **A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution**. *Gene* 1996, **180**(1-2):157-163.
529. Olsson PA, Korhonen L, Mercer EA, Lindholm D: **MIR is a novel ERM-like protein that interacts with myosin regulatory light chain and inhibits neurite outgrowth**. *J Biol Chem* 1999, **274**(51):36288-36292.
530. Soundararajan P, Fawcett JP, Rafuse VF: **Guidance of postural motoneurons requires MAPK/ERK signaling downstream of fibroblast growth factor receptor 1**. *J Neurosci* 2010, **30**(19):6595-6606.
531. Yamashita N, Uchida Y, Ohshima T, Hirai S, Nakamura F, Taniguchi M, Mikoshiba K, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N *et al*: **Collapsin response mediator protein 1 mediates reelin signaling in cortical neuronal migration**. *J Neurosci* 2006, **26**(51):13357-13362.
532. Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM: **Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33**. *Nature* 1995, **376**(6540):509-514.
533. Yamashita N, Takahashi A, Takao K, Yamamoto T, Kolattukudy P, Miyakawa T, Goshima Y: **Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition**. *Front Behav Neurosci* 2013, **7**:216.
534. Su KY, Chien WL, Fu WM, Yu IS, Huang HP, Huang PH, Lin SR, Shih JY, Lin YL, Hsueh YP *et al*: **Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory**. *J Neurosci* 2007, **27**(10):2513-2524.
535. Hensley K, Venkova K, Christov A, Gunning W, Park J: **Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodisease indications**. *Mol Neurobiol* 2011, **43**(3):180-191.
536. Lin PC, Chan PM, Hall C, Manser E: **Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are a new class of microtubule-associated protein (MAP) that selectively interacts with assembled microtubules via a taxol-sensitive binding interaction**. *J Biol Chem* 2011, **286**(48):41466-41478.
537. Pan SH, Chao YC, Hung PF, Chen HY, Yang SC, Chang YL, Wu CT, Chang CC, Wang WL, Chan WK *et al*: **The ability of LCRMP-1 to promote cancer invasion by enhancing filopodia formation is antagonized by CRMP-1**. *J Clin Invest* 2011, **121**(8):3189-3205.

538. Shen Y, Li N, Wu S, Zhou Y, Shan Y, Zhang Q, Ding C, Yuan Q, Zhao F, Zeng R *et al*: **Nudel binds Cdc42GAP to modulate Cdc42 activity at the leading edge of migrating cells**. *Dev Cell* 2008, **14**(3):342-353.
539. Leemhuis J, Bouche E, Frotscher M, Henle F, Hein L, Herz J, Meyer DK, Pichler M, Roth G, Schwan C *et al*: **Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation**. *J Neurosci* 2010, **30**(44):14759-14772.
540. Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain JC, Pelling M, Duran-Jimeniz B, Camargo LM, Oliver KR, Beher D, Shearman MS *et al*: **Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders**. *Mol Cell Neurosci* 2004, **25**(1):42-55.
541. Ottis P, Bader V, Trossbach SV, Kretzschmar H, Michel M, Leliveld SR, Korth C: **Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggresomes**. *Biol Psychiatry* 2011, **70**(7):604-610.
542. Jaaro-Peled H, Hayashi-Takagi A, Seshadri S, Kamiya A, Brandon NJ, Sawa A: **Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1**. *Trends Neurosci* 2009, **32**(9):485-495.
543. Hennah W, Porteous D: **The DISC1 pathway modulates expression of neurodevelopmental, synaptogenic and sensory perception genes**. *PLoS One* 2009, **4**(3):e4906.
544. Itoh N, Terachi T, Ohta M, Seo MK: **The complete amino acid sequence of the shorter form of human basic fibroblast growth factor receptor deduced from its cDNA**. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **169**(2):680-685.
545. van Scheltinga AFT, Bakker SC, Kahn RS: **Fibroblast Growth Factors in Schizophrenia**. *Schizophrenia Bulletin* 2010, **36**(6):1157-1166.
546. Beglopoulos V, Montag-Sallaz M, Rohlmann A, Piechotta K, Ahmad M, Montag D, Missler M: **Neurexophilin 3 Is Highly Localized in Cortical and Cerebellar Regions and Is Functionally Important for Sensorimotor Gating and Motor Coordination**. *Molecular and Cellular Biology* 2005, **25**(16):7278-7288.
547. Piantadosi CA, Withers CM, Bartz RR, MacGarvey NC, Fu P, Sweeney TE, Welty-Wolf KE, Suliman HB: **Heme Oxygenase-1 Couples Activation of Mitochondrial Biogenesis to Anti-inflammatory Cytokine Expression**. *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(18):16374-16385.
548. Muller N, Schwarz MJ: **Immune System and Schizophrenia**. *Curr Immunol Rev* 2010, **6**(3):213-220.
549. Engin E, Liu J, Rudolph U: **α2-containing GABAA receptors: A target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders**. *Pharmacology & Therapeutics* 2012, **136**(2):142-152.
550. Li D, Sulovari A, Cheng C, Zhao H, Kranzler HR, Gelernter J: **Association of gamma-aminobutyric acid A receptor alpha2 gene (GABRA2) with alcohol use disorder**. *Neuropsychopharmacology* 2014, **39**(4):907-918.
551. Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T, Nagata K-i: **Identification of a cell polarity-related protein, Lin-7B, as a binding partner for a Rho effector, Rhotekin, and their possible interaction in neurons**. *Neuroscience Research* 2006, **56**(4):347-355.
552. Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Fulda KG, Kaur M, Gonzalez K, Vishwanatha JK, Santella RM, Morabia A: **Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood**. *Epigenetics* 2011, **6**(5):623-629.
553. Picchioni MM, Murray RM: **Schizophrenia**. *BMJ* 2007, **335**(7610):91-95.
554. Cullen KR KS, Regan J: **Atypical Antipsychotics for Treatment of Schizophrenia Spectrum Disorders**. *Psychiatric Times* 2008, **25**(3).
555. **Gender Differences in Schizophrenia and First-Episode Psychosis: A Comprehensive Literature Review**. *Schizophrenia Research and Treatment* 2012, **2012**:9.

556. Du an Lazarevi VVoe, Vladan osi , Predrag Vlahovi , Suzana To i -Golubovi , Tatjana Risti , Vidosava B. or evi: **Increased Lymphocyte Caspase-3 Activity in Patients with Schizophrenia**. *Journal of Medical Biochemistry* 2011.
557. Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA: **Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia**. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2005, **29**(5):846-858.
558. Kerns D, Vong GS, Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P, Haroutunian V, Byne W: **Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia**. *Schizophrenia Research* 2010, **120**(1–3):150-158.
559. Catts VS, Catts SV, McGrath JJ, Féron F, McLean D, Coulson EJ, Lutze-Mann LH: **Apoptosis and schizophrenia: A pilot study based on dermal fibroblast cell lines**. *Schizophrenia Research* 2006, **84**(1):20-28.
560. Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Trotti D: **Caspase-3 Cleaves and Inactivates the Glutamate Transporter EAAT2**. *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(20):14076-14084.
561. Sari Y, Zhou FC: **Prenatal Alcohol Exposure Causes Long-Term Serotonin Neuron Deficit in Mice**. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2004, **28**(6):941-948.
562. Porter AG, Janicke RU: **Emerging roles of caspase-3 in apoptosis**. *Cell Death Differ* 1999, **6**(2):99-104.
563. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS: **Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP**. *Cell* 2001, **104**(5):791-800.
564. Meynen G, Unmehopa UA, Hofman MA, Swaab DF, Hoogendijk WJ: **Hypothalamic oxytocin mRNA expression and melancholic depression**. *Mol Psychiatry* 2007, **12**(2):118-119.
565. Kyosseva S: **The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in cerebellar abnormalities in schizophrenia**. *The Cerebellum* 2004, **3**(2):94-99.
566. Liekens AM, De Knijf J, Daelemans W, Goethals B, De Rijk P, Del-Favero J: **BioGraph: unsupervised biomedical knowledge discovery via automated hypothesis generation**. *Genome Biol* 2011, **12**(6):R57.
567. Lin DC, Quevedo C, Brewer NE, Bell A, Testa JR, Grimes ML, Miller FD, Kaplan DR: **APPL1 Associates with TrkA and GIPC1 and Is Required for Nerve Growth Factor-Mediated Signal Transduction**. *Molecular and Cellular Biology* 2006, **26**(23):8928-8941.
568. Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV: **BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex**. *Nat Neurosci* 2006, **9**(8):1009-1018.
569. Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL: **Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease**. *Reproductive Toxicology* 2007, **23**(3):297-307.
570. Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A: **Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain**. *Epigenetics* 2010, **5**(8):730-735.
571. Shimabukuro M, Jinno Y, Fuke C, Okazaki Y: **Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats**. *Behav Brain Funct* 2006, **2**(1):1-5.
572. Boks MP, de Jong NM, Kas MJH, Vinkers CH, Fernandes C, Kahn RS, Mill J, Ophoff RA: **Current status and future prospects for epigenetic psychopharmacology**. *Epigenetics* 2012, **7**(Scientific review):20-28.
573. Dong E, Nelson M, Grayson DR, Costa E, Guidotti A: **Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(36):13614-13619.
574. Li J, Guo Y, Schroeder FA, Youngs RM, Schmidt TW, Ferris C, Konradi C, Akbarian S: **Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling**. *Journal of Neurochemistry* 2004, **90**(5):1117-1131.

575. Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E, Girault JA: **Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol**. *J Neurosci* 2008, **28**(22):5671-5685.
576. Chen C-Y, Gherzi R, Ong S-E, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJM, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M: **AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs**. *Cell* 2001, **107**(4):451-464.
577. Chuo LJ, Sheu WH, Pai MC, Kuo YM: **Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with late-onset Alzheimer disease**. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2007, **23**(4):251-257.
578. Maetzler W, Schmid B, Synofzik M, Schulte C, Riester K, Huber H, Brockmann K, Gasser T, Berg D, Melms A: **The CST3 BB genotype and low cystatin C cerebrospinal fluid levels are associated with dementia in Lewy body disease**. *J Alzheimers Dis* 2010, **19**(3):937-942.
579. Panteghini C, Zorzi G, Venco P, Dusi S, Reale C, Brunetti D, Chiapparini L, Zibordi F, Siegel B, Garavaglia B *et al*: **C19orf12 and FA2H Mutations Are Rare in Italian Patients With Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation**. *Seminars in Pediatric Neurology* 2012, **19**(2):75-81.
580. Tonelli A, D'Angelo MG, Arrigoni F, Brighina E, Arnoldi A, Citterio A, Bresolin N, Bassi MT: **Atypical adult onset complicated spastic paraparesis with thin corpus callosum in two patients carrying a novel FA2H mutation**. *European Journal of Neurology* 2012, **19**(11):e127-e129.
581. Matsushita H, Uenaka A, Ono T, Hasegawa K, Sato S, Koizumi F, Nakagawa K, Toda M, Shingo T, Ichikawa T *et al*: **Identification of glioma-specific RFX4-E and -F isoforms and humoral immune response in patients**. *Cancer Sci* 2005, **96**(11):801-809.
582. Zhang D, Stumpo DJ, Graves JP, DeGraff LM, Grissom SF, Collins JB, Li L, Zeldin DC, Blackshear PJ: **Identification of potential target genes for RFX4_v3, a transcription factor critical for brain development**. *Journal of Neurochemistry* 2006, **98**(3):860-875.
583. Lester D, Farquharson C, Russell G, Houston B: **Identification of a Family of Noncanonical Ubiquitin-Conjugating Enzymes Structurally Related to Yeast UBC6**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, **269**(2):474-480.
584. Kirchhausen T, Davis AC, Frucht S, Greco BO, Payne GS, Tubb B: **AP17 and AP19, the mammalian small chains of the clathrin-associated protein complexes show homology to Yap17p, their putative homolog in yeast**. *Journal of Biological Chemistry* 1991, **266**(17):11153-11157.
585. Kim D, Gnatenco C: **TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K+ Channel Family**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, **284**(4):923-930.
586. Karschin C, Wischmeyer E, Preisig-Muller R, Rajan S, Derst C, Grzeschik KH, Daut J, Karschin A: **Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system**. *Mol Cell Neurosci* 2001, **18**(6):632-648.
587. West S, Gromak N, Proudfoot NJ: **Human 5[prime] [rarr] 3[prime] exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites**. *Nature* 2004, **432**(7016):522-525.
588. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB: **Calorimetric analysis of the plasma proteome**. *Semin Nephrol* 2007, **27**(6):621-626.
589. Maes M, Delange J, Ranjan R, Meltzer HY, Desnyder R, Cooremans W, Scharpe S: **Acute phase proteins in schizophrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs**. *Psychiatry Res* 1997, **66**(1):1-11.
590. Tichaczek-Goska D: **Deficiencies and excessive human complement system activation in disorders of multifarious etiology**. *Adv Clin Exp Med* 2012, **21**(1):105-114.
591. Uzbekov MG, Smolina NV, Misionzhnik E, Molodetskikh AV, Dobretsov GE, Gryzunov Iu A: **[Conformational disturbances of serum albumin binding sites in schizophrenia]**. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2008, **108**(5):67-70.

592. Todinova S, Krumova S, Kurtev P, Dimitrov V, Djongov L, Dudunkov Z, Taneva SG: **Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients**. *Biochim Biophys Acta* 2012, **1820**(12):1879-1885.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата: ..... Подпис: .....

гр. София /Блага Борисова Рукова/