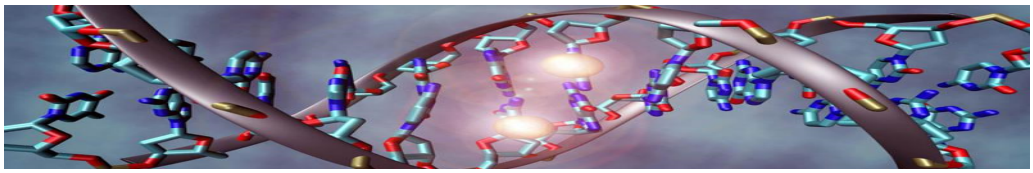
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

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



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен "ДОКТОР"
Област на висше образование: 4.„Природни науки, математика и информатика"
Професионално направление: 4.3. „Биологически науки"
Научна специалност: „Генетика"
Научен ръководител: чл. кор. проф. Драга Тончева, дбн

София, 2015г.

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен "ДОКТОР"
Област на висше образование: 4.„Природни науки, математика и информатика"
Професионално направление: 4.3. „Биологически науки"

Научна специалност: „Генетика"

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

НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ:
Председател: - становище – чл. кор. проф. Драга Тончева
Членове: 1. – рецензент – проф. Стоян Лалчев
2. – рецензент – доц. Вили Стоянова
3. – становище – доц. Мария Симеонова
4. – становище – доц. Светослав Димов

София, 2015г.

Изследванията по дисертационния труд са финансирани частично от:

Фонд „Научни изследвания” към МОМН - „Протеомен скрининг в серум от пациенти с шизофрения при различни етапи и видове терапия” № ДО 02-12/10.02.2010г. и „Определяне на специфични епигенетични промени при пациенти с шизофрения чрез метилационен днк-микрочипов анализ” - № ДМУ 03-36/12.12.2011г.;

Медицински Университет – София - „Алтернативен метод за мониторинг на промени в серумния протеом при шизофрения” - Договор № 22-Д/2011 г., проект № 12-Д, СМН, МУ-София

Изследванията са извършени в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински факултет, Медицински университет-София и Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН.

Докторантът е зачислен за задочна докторантура към Катедрата по Медицинска генетика, Медицински факултет, Медицински университет – София със Заповед № Р-735/09.04.2009г., 21.05.2009г.

Дисертационният труд обхваща 203 стандартни страници, от които 155 страници основен текст (въведение – 2 стр., литературен обзор – 57стр., цел и задачи – 1 стр. материали и методи – 48 стр., резултати - 33 стр., обсъждане, заключение, изводи и приноси – 21 стр.). Литературната справка обхваща 592 източника. Дисертацията съдържа 53 фигури и 23 таблици.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Медицинска генетика, Медицински факултет, Медицински университет – София на 04.02.2015 г.

Публичната защита ще се състои на 29.04.2015г. от 15:00 часа в аудиторията на СБАЛАГ „Майчин дом“.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Медицинска генетика, Медицински университет – София, 6^{ти} етаж, СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. Здраве № 2, 1431 София.

Автор: Блага Борисова Рукова

Заглавие: „Характеризиране на метилационни профили при пациенти с шизофрения”

Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика”

Професионално направление: 4.3. „Биологически науки”

Научна специалност: „Генетика”

Съдържание

Въведение 7

Цел и задачи 9

Материали и методи 10

1. Изготвяне на сборни ДНК проби (пулове) 10

2. Микрочипов анализ на имунопреципитирана метилирана ДНК 11

3. Валидиране на метода на метилационния микрочипов анализ. 14

4. Протеомен анализ 16

Резултати 19

1. Цялостно геномно метилационно профилиране при пациенти с шизофрения, сравнени със здрави контроли 19

2. Разлики в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола 27

3. Потвърждаване на различията от цялостния геномен метилационен пул анализ при индивидуални пациенти 29

4. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 30

5. Валидиране на метода на метилационен ДНК микрочипов анализ 38

6. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 39

6.1. Калориметрични профили на кръвни серуми от пациенти с шизофрения 40

6.2. Определяне на концентрацията на серумните белтъци чрез капилярна електрофореза 44

6.3. Проследяване на протеомните промени с ДСК при пациенти с шизофрения 45

Обсъждане 48

1. Обсъждане на резултатите от цялолостния геномен метилационен анализ на кандидат-гени за шизофрения 48

2. Обсъждане на разликите в цялостния геномен метилационен профил, определени от разлики в пола 52

3. Динамика на метилационните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 54

4. Динамика на протеомните профили преди и след лечение на болни с шизофрения 59

Заключение 64

Приноси 67

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 резвизирано издание
GWAS	Цялостно геномно асоциативно проучване
bp	Нуклеотидни двойки
NMDA	N-метил-D-апартатна киселина (N-methyl-D-aspartic acid)
Odds ratio	Съотношение на шансовете
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. 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.

III. 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 индивидуаленлационен 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). ДНК метилационен микрочипов анализ е проведен на 240 пациента, а на 92 е проведен протеомен анализ.

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.

Метилационния микрочипов анализ е проведен с високомолекулна геномна ДНК, изолирана от кръв с фенол-хлороформна екстракция. От всеки участник е взета венозна кръв (10 мл) от кубиталната вена, чрез затворена вакутейнер система, при спазване на стандартните процедури за стерилност.

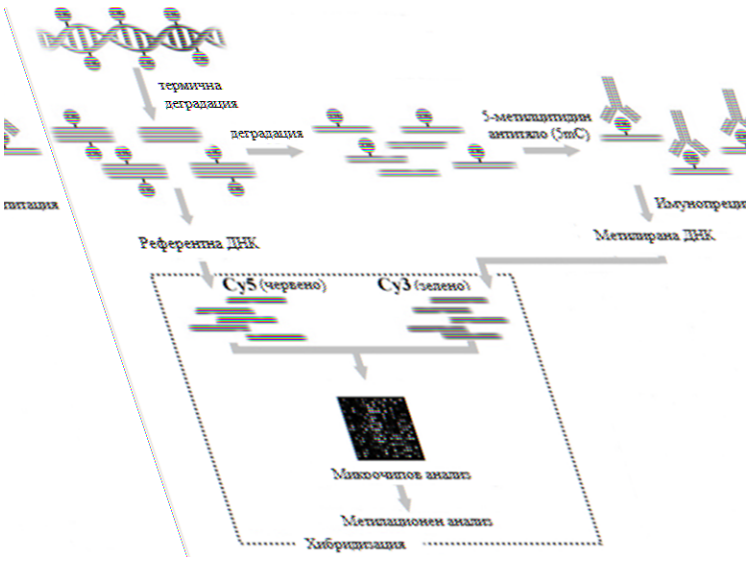
1. Изготвяне на сборни ДНК проби (пулове)

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). 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.

2. Микрочипов анализ на имунопреципитирана метилирана ДНК

За анализа е използван метода на сравнителната геномна хибридизация чрез метилационни олиго микрочипове. Тази техника е високоефективна, с добра възпроизводимост и позволява 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. 1).

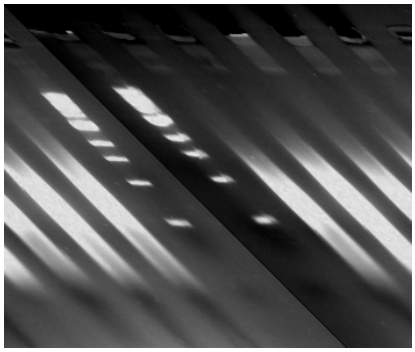


Фигура 1. Схема, представяща техниката на метилационни олиго микрочипове. Използвани са олигонуклеотидни микрочипове с платформата на Agilent, формат 1x244K, с гъстота 237,227 секвенции, обхващащи 27,627 CpG острови.

Метилираната ДНК се изолира с помощта на имунопреципитация. Тя представлява 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).

Имунопреципитация на метилирана ДНК (MeDIP)

Изолираната и пречистена геномна ДНК се подлага на термична деградация с цел срязване на ДНК на произволни фрагменти с размер между 300-1000 базови двойки (bp) в дължина (Фиг.2).



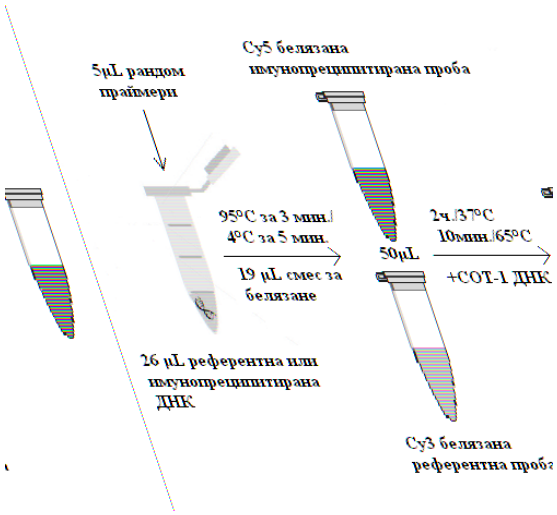
Фигура 2. Оценка на дължината на ДНК фрагментите след термична деградация върху 1% агарозен гел.

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.

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 (Cyanine 3) – зелено, докато референтната проба е маркирана с друга боя (Cyanine 5) – червено (Фиг.3).



Фигура 3. Белязане на имунопреципитираната и референтната ДНК.

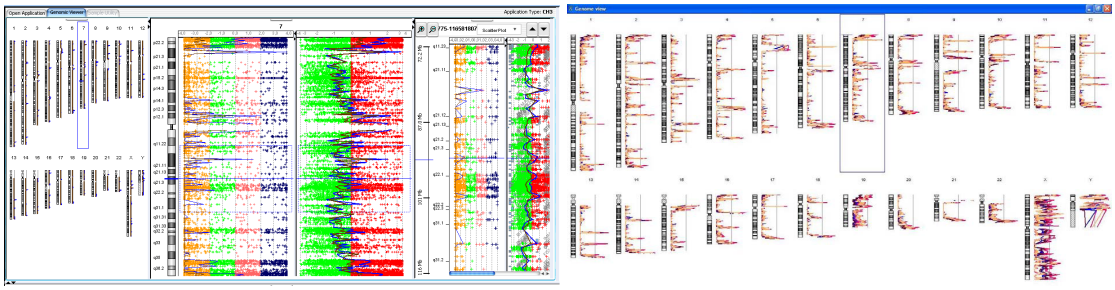
Хибридизация и промивка на микрочиповете

Белязаните ДНК проби кохибридизират върху 2-канален ДНК метилационен 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.

Промивка и сканиране на хибридизираните микрочипове

Хибридизираните стъкла се промиват с цел да се отстранят неспецифично свързаните белязани нуклеотиди. 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. Получените образи се обработват с програмите Agilent Feature Extraction 11.0.1.1 и Agilent Workbench 6.5.0.18. За всеки от пациентите и

контролите, резултатите са представени с няколко параметъра - log2ratio, z-score и BATMAN (A Bayesian Tool for Methylation Analysis). По последни данни, най-подходящ статистически инструмент за анализ на MeDIP профили е използването на BATMAN критерий. 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 (Фиг. 4).

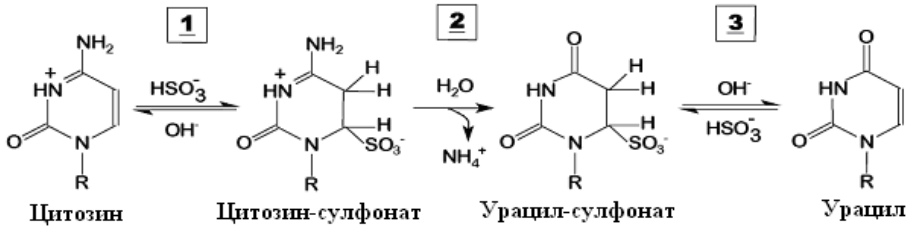


Фигура 4. Анализирани метилационни профили с Agilent Workbench 6.5.0.18.

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. Ръчното извършване на анализа е изключително трудоемък и сложен процес, свързан с възможности за грешка, поради което в Катедрата по Медицинска генетика беше разработен специален софтуер за интерпретация на получените данни – Methylation analysis. 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.

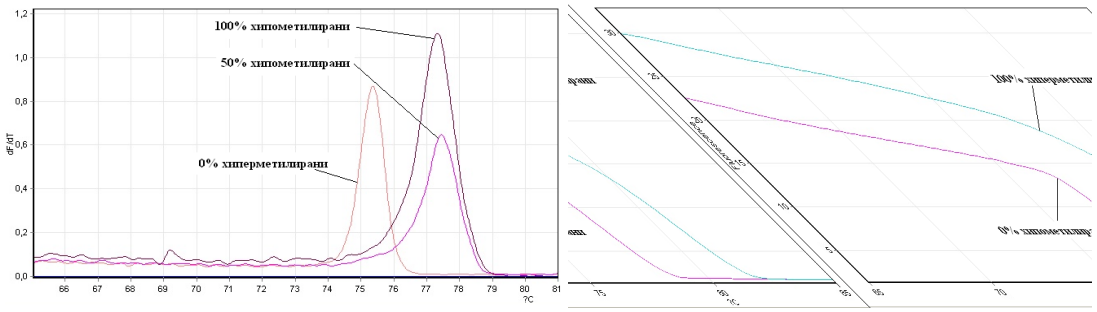
3. Валидиране на метода на метилационния микрочипов анализ.

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 метилацонният статус на специфични генетични локуси. Поцедурата включва бисулфитно третиране на цялостната геномна ДНК, при което неметилирания цитозин се превръща в урацил (Фиг.5).



Фигура 5. Бисулфитно превръщане на геномна ДНК

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 (Фиг.6). PCR праймерите и ампликоните са подбрани според строги критерии и осигуряват необходимото ниво на чувствителност.



Фигура 6. Метилационен профил на метилирана и неметилирана ДНК последователност.

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.1):

Таблица 1. Секвенция на праймерите за HRM анализ.

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

4. Протеомен анализ

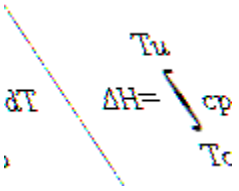
За протеомен анализ кръвта се събира в пластмасови вакутейнери с червена капачка и гел за събиране на серум. Кръвта е обработвана не по-рано от 30 мин. и не по-късно от 4-6ч. след вземането.

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. 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:



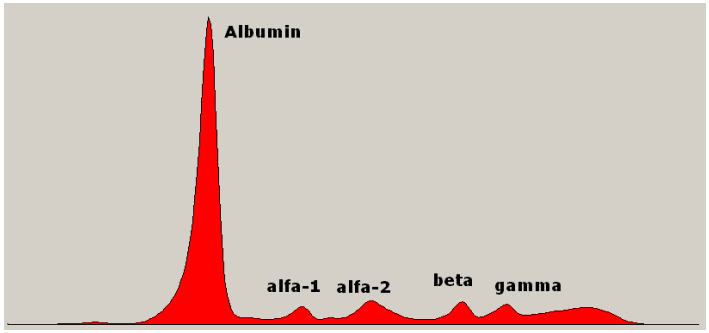
където T_0 и Tu са температурите на началото и края на прехода съответно, и Δc_P (промяната на топлинния капацитет, свързана с прехода). Освен това се счита, че ширината на полу-височината на прехода $T_{m1/2}$ е мярка за кооперативността на прехода нагънато-разгънато състояние.

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. Електрофорезата на серумните белтъци се извършва на MINICAP, Sebia Electrophoresis instrument (Фиг. 7).

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 техния размер/заряд, в капиляри пълни с електролит и прецизно определяне на концентрацията на по-горе посочените серумни белтъци.



Фигура 7. Електрофоретичен профил на серумни белтъци.

Статистически анализ на термограми на кръвна плазма/серум

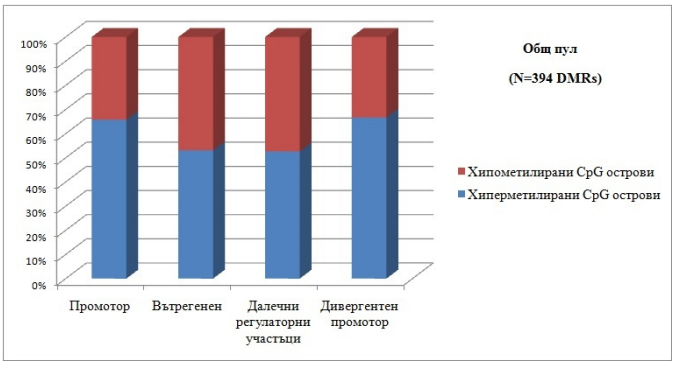
За анализ на получените резултати е приложен разработеният от Fish et al. 2010 алгоритъм за анализ и класифициране на ДСК профили, приложен до момента само за лаймска болест. Приема се, че специфичният топлинен капацитет на кръвен серум е нормално разпределен при здрави индивиди. Това следва от факта, 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.

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

IV. Резултати

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

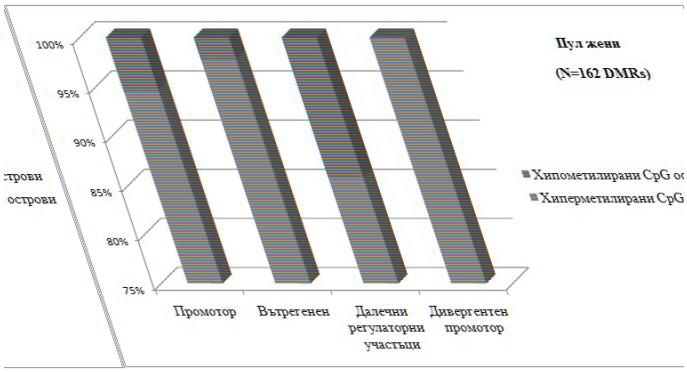
Според литературни данни, островът се определя като „хипер- или хипометилиран“ при наличие на повече от 60% от съответния метилационен статус на анализираните секвенции в острова (BATMAN коефициент съответно 1 или -1). На базата на този критерий са сравнени данните от анализа на сборни ДНК проби от пациенти 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. 8. 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 8. 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. 9 и 10.

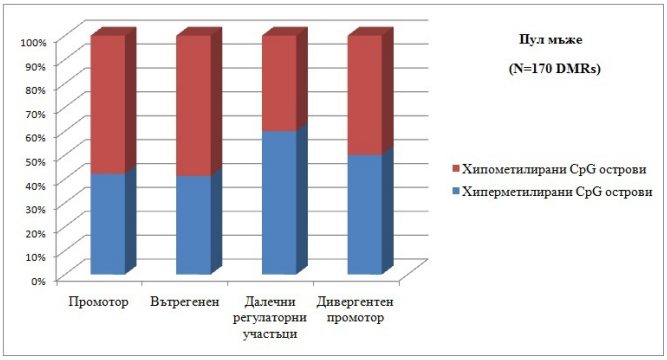
При сравняването на пуловете от пациенти и контроли от женски пол се установява значително по-голям брой на хиперметилираните спрямо хипометилираните CpG острови (156 спрямо 6). Отново най-силно са засегнати вътрегенните (86/2). В промоторните области се установяват 52 хиперметилирани и 3 хипометилирани 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 9. 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 10. 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. 2).

Таблица 2. 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.3).

Таблица 3. 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

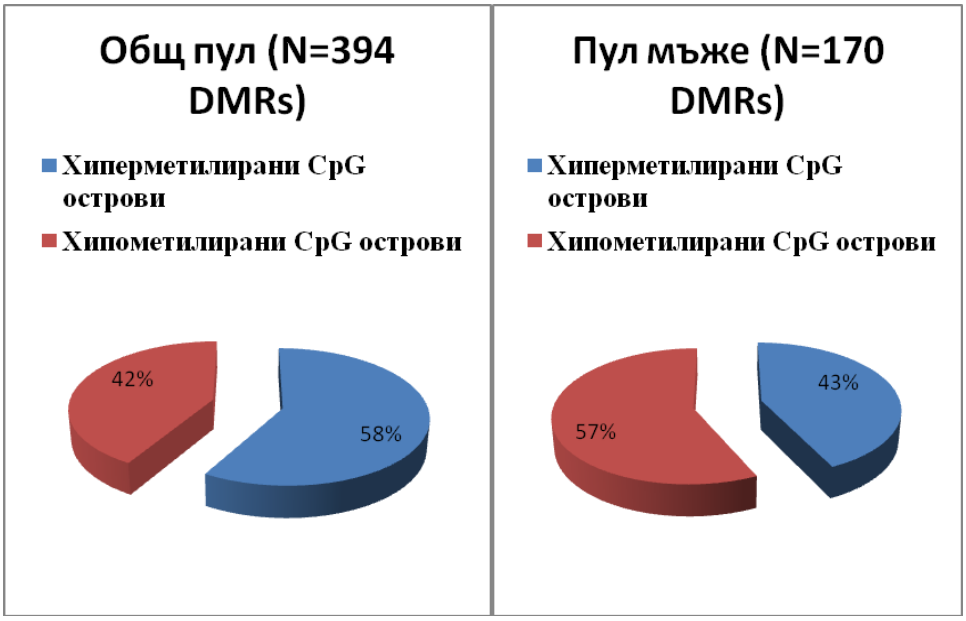
В литературата има множество статии, които показват, че хиперметилирането на CpG островите в промоторните региони на гените оказва негативен ефект на нивото на генна експресия. До момента интерпретацията на ефекта от метилирането на CpG островите вътре в гена или в други регулаторни области не е определено 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.

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. 11).



Фигура 11. 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. 12).



А Б

Фигура 12. 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 4 показва най-добрите 10 кандидат гени с променен метилационен профил в общия пул.

Таблица 4. 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. 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. 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.

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

Известно е, че съществуват различия между половете по отношение на метилационния статус. По тази причина са изследвани разликите в метилационния профил в разделени по пол пулове от пациенти и контроли. Таблица 5 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 6 показва топ 10 от 162 гена с различен метилационен профил в пул от пациенти жени с шизофрения, сравнени с жени здрави контроли.

Таблица 5. 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 6. 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 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 6). 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 5). 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:

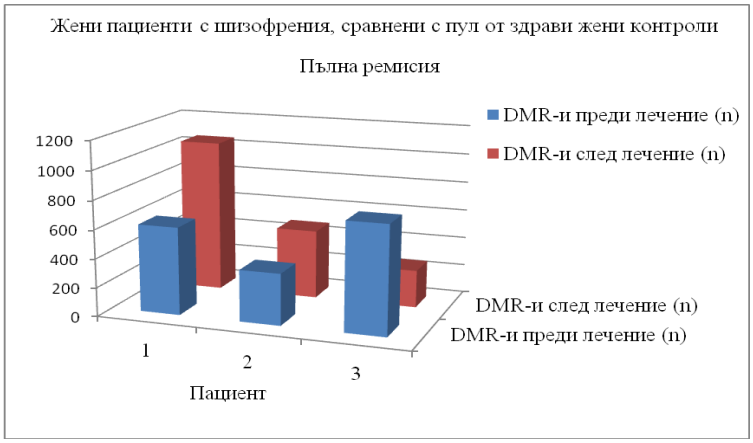
1. Жени пациенти с шизофрения с пълна ремисия - 3 пациенти;

2. Жени пациенти с шизофрения с непълна ремисия - 5 пациенти;

3. Мъже пациенти с шизофрения с пълна ремисия - 3 пациенти;

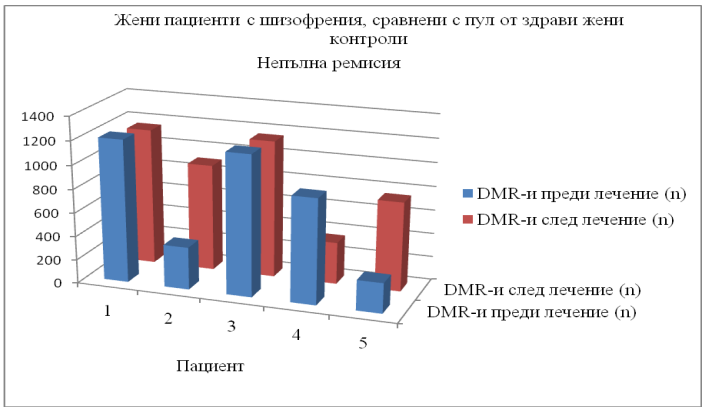
4. Мъже пациенти с шизофрения с непълна ремисия - 9 пациенти.

При всеки пациент във всяка от групите е определен броят DMR-и (между 255 и 1648). Резултатите от този анализ са показани на фигура 13. 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.



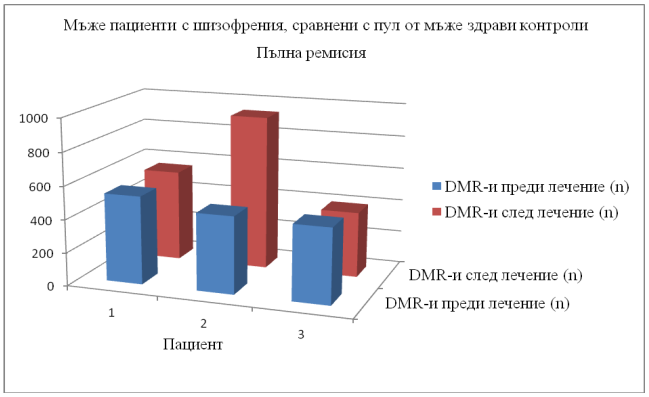
Фигура 13. Брой на DMR-ите при жени с шизофрения в пълна ремисия преди и след лечение.

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. 14).



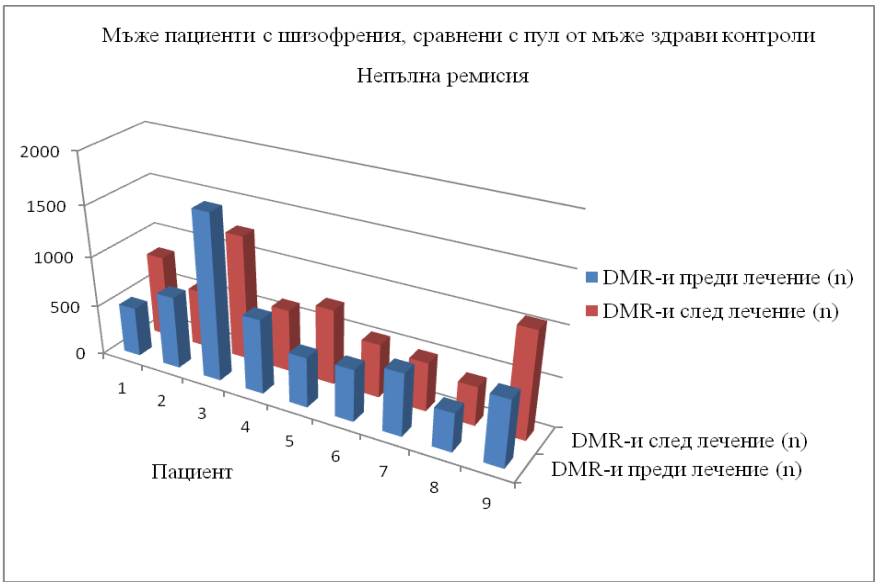
Фигура 14. Брой на DMR-ите при жени с шизофрения в непълна ремисия преди и след лечение.

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. 15).



Фигура 15. 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.16).



Фигура 16. 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.

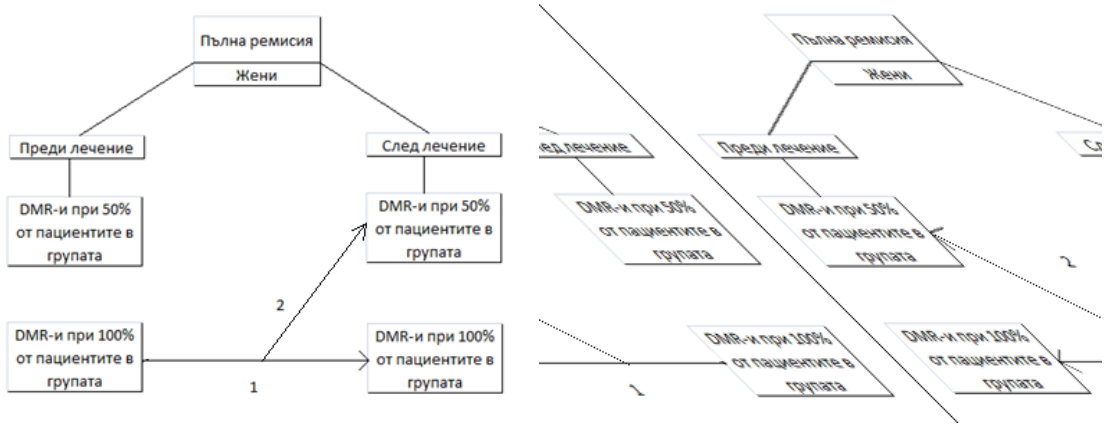
Втората стъпка при анализа на данните е да се сравнят DMR-ите при пациентите във всяка от групите. Критерият, който се използва за подбор на DMR-и със значение за заболяването е съответният DMR да се среща в повече от 50% от пациентите в съответната група. Като DMR-и с най-голямо значение се приемат 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. 7).

Таблица 7. 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. 17). 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 17. 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. 8).

Таблица 8. 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 9 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.

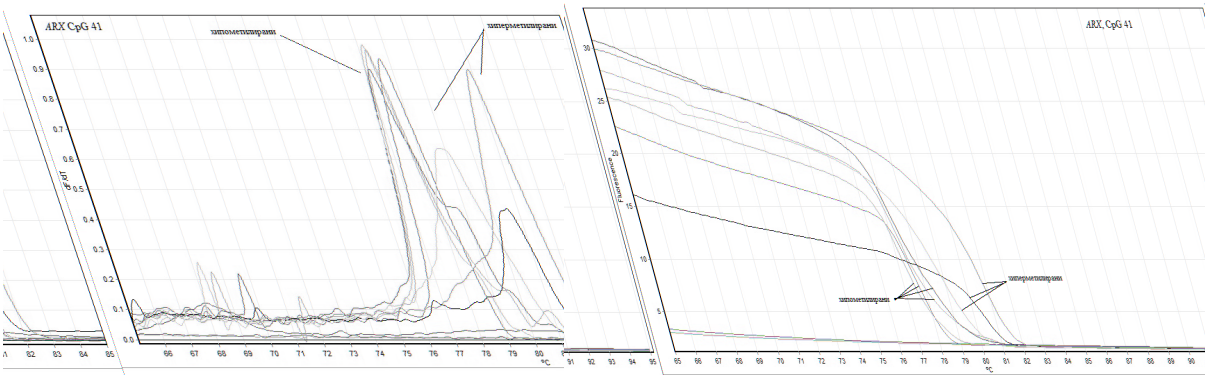
Таблица 9. Функция на гените с DMR-и при групата от мъже пациенти с шизофрения с пълна ремисия преди и след лечение.

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

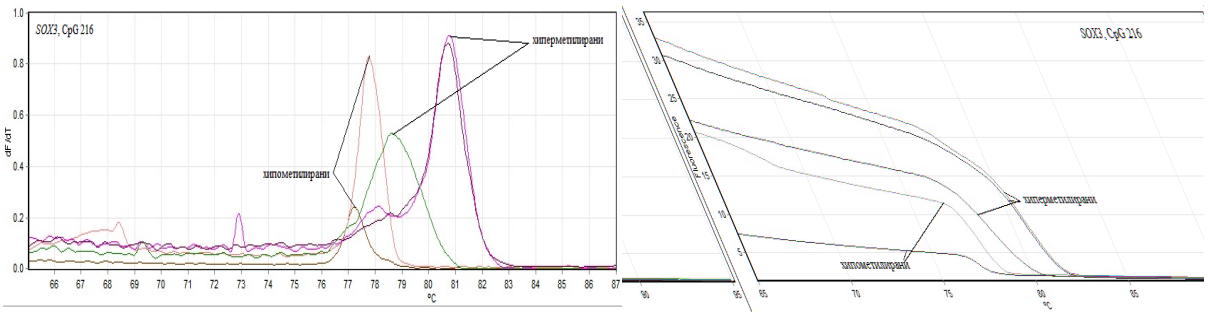
I. Валидиране на метода на метилационен ДНК микрочипов анализ

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. 18), 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 18. Метилационен 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. 19). 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.

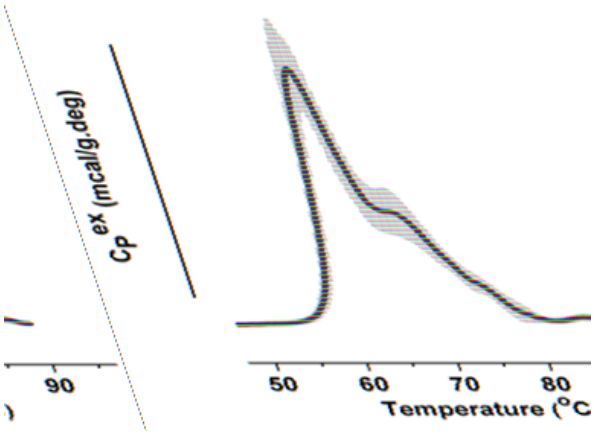


Фигура 19. Метилационен профил на CpG 216 на *SOX3* гена.

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

6.1. Калориметрични профили на кръвни серуми от пациенти с шизофрения

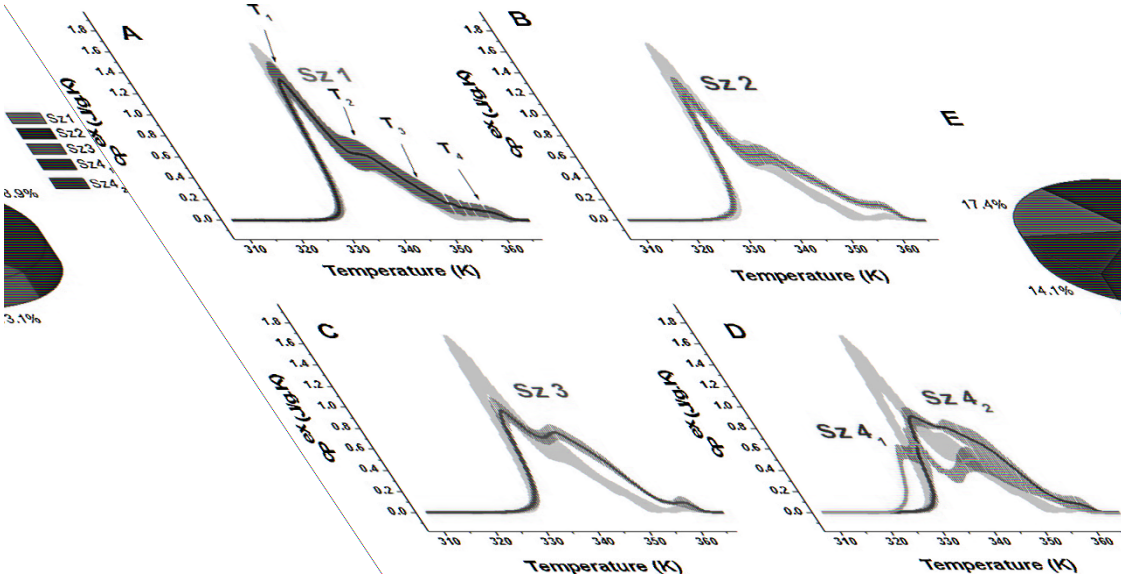
Проведените изследвания на кръвен серум през различни етапи от тяхната медикаментозна терапия чрез метода на диференциална сканираща калориметрия показаха значителни разлики между ДСК термограмите на изследваните пациенти с шизофрения и тези характерни за здрави индивиди.



Фигура 20. 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. 20), 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. 21). 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 21. 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. 21). 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. 21, 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. 21).

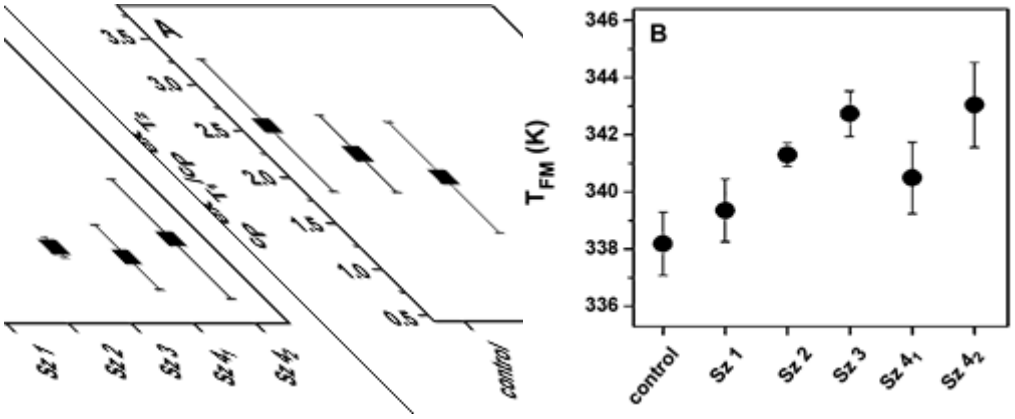
В 79% от случаите техните температури на преход съвпадат с T_1, T_2 и T_4 в контролната група, докато в останалата част от термограмите те значително се отклоняват от тези, намерени при здрави индивиди. Във всички групи от пациенти много трудно се открива прехода T_3. ДСК профилите на пациентите с шизофрения се разделят в четири групи на базата на отношението $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$ (фиг. 22 А):

- Sz1, $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$=2.25±0.42, подобни на контролната група;
- Sz2, $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$=2.00±0.60, леко отклоняващи се от контролната група;
- Sz3, $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$=1.26±0.11, силно отклоняващи се от контролната група;
- Sz4 е разделена на две подгрупи (те имат сходни $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$, но се различават по максимумите на температурите на съответните преходи):
    a. Sz41, $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$=1.15±0.35;
    b. Sz42,, $\angle C_p^{exp}{}_{T_1} / C_p^{exp}{}_{T_4}$=1.35±0.65

Средните ДСК профили за четирите групи са представени на фиг. 21 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. 21D). Характерно за тази група е разцепването на първия преход на два прехода. Докато при Sch1 - Sch3 топлинният капацитет на първия преход при 62°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 cePxT1 /cPexT2 и TFM, в групите са представени на Фиг. 22.



Фигура 22. Термодинамични параметри на калориметричните групи. Съотношение на преходите на топлинните капацитети на албумин и имуноглобулини, cexTP1/cPexT2 (A) и температурата на първия момент, TFM (B).

Наблюдава се прогресивно намаляване на отношението cPexT1 /cPexT2 от първа към четвърта група. TFM са по-високи при всички групи от пациенти в сравнение с контролната термограма. (Фиг. 22). 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. 10).

Таблица 10. 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

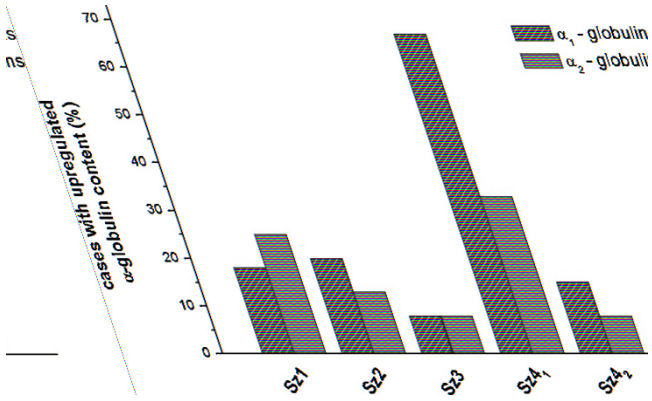
Отношението cPexT1/cPexT2 има по-ниска стойност за Sch1-4 групите, докато енталпията ΔHcal на процеса не се различава съществено в сравнение със стойностите за здрави индивиди (Таблица 10). Температурата на първия момент TFM е с няколко градуса по-висока за Sch1-4 групите от тази за контролните термограми, 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. 23). 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.



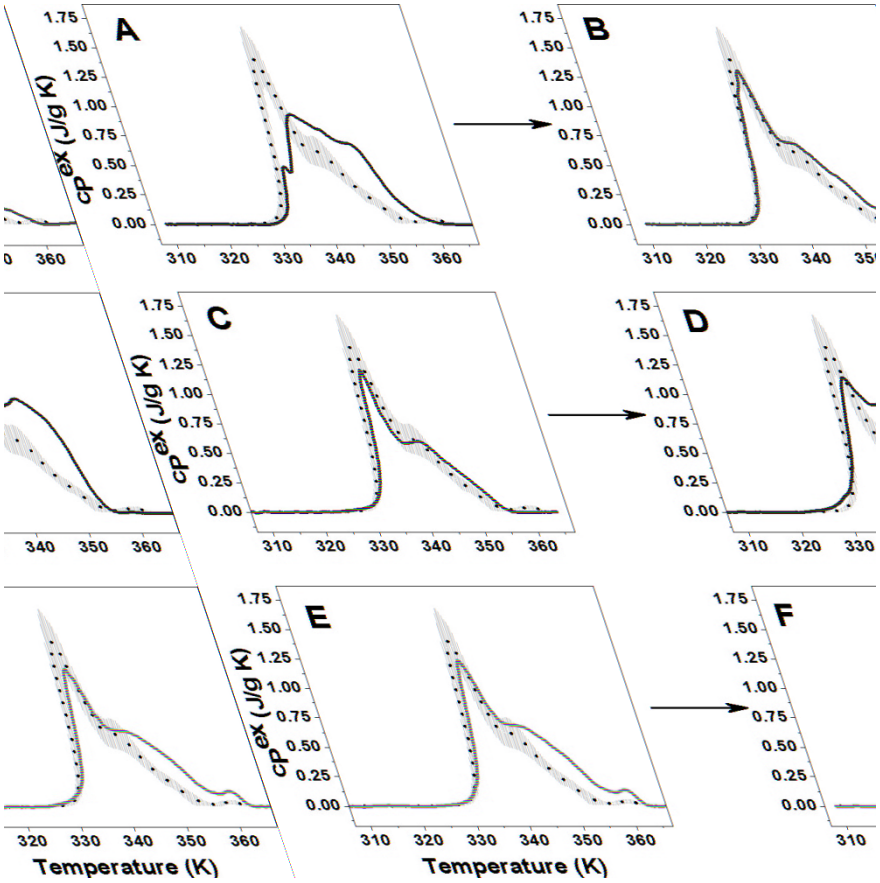
Фигура 23. Случаи с по-високи серумни нива на фракциите на α1- и α2-глобулините от горната граница типична за здрави хора. Данните са представени като процент от общия брой на случаи в рамките на всяка от Sz1-4 групите. Концентрациите на α1- и α2-глобулините бяха определени чрез електрофореза на серумни 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. 24).

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. 24 A и B). 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. 24 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. 24 E и F).



Фигура 24. 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.

V. 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. 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.

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. 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. 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. 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. 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. 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. Проведено е изследване за характеризиране на метилома, при което са изследвани мозъчна тъкан и кръв от едни и същи пациенти. 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. 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.

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.

MYLIP, *CRMP1* и *FGFR1* играят важна роля в развитието на нервната система. *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.

CRMP1 кодира член от семейството на цитозолните фосфопротеини, експресиращи се в значителна степен в нервната система. Кодираният белтък е част от семафориновия-3а-зависим сигнален път в невроните на развиващия се мозък и участва във reelin-зависимата радиална невронална миграция. Играе роля в насочването на аксоните, растежа и клетъчната миграция. *CRMP1* посредничи в *reelin* сигнализацията при кортикалната невроналната миграция. *CRMP1* дефицитни мишки показват нарушено дългосрочно потенциране и нарушения в заучаването и паметта. 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. *CRMP1* има роля в поддържане на цитоскелета чрез стабилизиране на свързването на микротубулите и участва в F-актиновата полимеризация - процес критично регулиран по време на формирането и поддръжката на синапсите или невроналната миграция. *CRMP1lv* се регулира от cdc42 - протеин, активиран от *reelin* и *NDEL1*, който е важен участник в *DISC1* пътя. 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. *CRMP1* има отношение към анхедонията. При изследване на лимфобластни клетъчни линии от пациенти с шизофрения е установена по-високата му експресия. 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*.

Белтъкът, 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.

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.

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.

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, като това подкрепя една от основните хипотези за развитието на шизофрения - имунологичната.

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. 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.

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.

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

Известно е, че ДНК метилирането също е полово-специфично. 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.

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. Така че нашите резултати подкрепят апоптичния механизъм в патофизиологията на шизофрения. *CASP3* участва в регулацията на серотониновата и глутаматната невротрансмисия. Този ген е от значение и за нормалното ембрионално развитие на мозъка.

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. В множество изследвания е предположена известна връзка на *GABRD* гена с шизофрения. 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. 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, учението и паметта. DHX37 показва хеликазна активност. GIPC1 генът участва в BDNF-медиираната невротрансмисия и растежа и развитието на невронните израстъци. 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 неоднозначно 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. 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.

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. 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. 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. Рисперидонът поддържа цялостното H3 фосфо-ацетилиране в стриатума. 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.

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. Точната функция на продукта, кодиран от този ген за момента не е известна, но се предполага, че играе роля в деградацията на иРНК. 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. Предполагаме, че този ген е инхибиран, защото в нашето изследване преди прилагане на лечението е хипометилиран вътрегенно. Функцията му е свързана с образуване на амилоидни плаки, които участват при някои мозъчни заболявания. 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. Той се експресира в мозъчните клетки. 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. 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. 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. 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. 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.

XRN2 гена кодира 5'-3' екзо-рибонуклеаза 2. Тя играе роля в метаболизма на РНК. 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. 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. 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. Michnik et al. 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. Така например проби от 30 пациенти диагностицирани с карцином на белите дробове показват уникална термограма, различна от тази на контролите.

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.

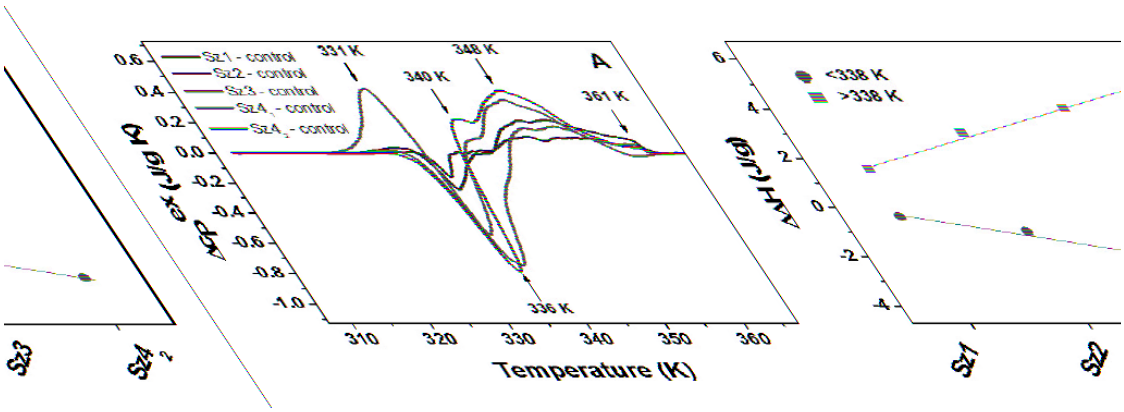
Термична стабилизация на фракцията на белтъците с най-висока концентрация в серумния протеом

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 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. 25A).

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

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. 25B). 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 ΔΔH 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 25. 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.

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. 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, докато при амиотрофична латерална склероза, рак на яйчника и меланом е по-силно изразен на термограмата на пациентите, отколкото на тази при здрави индивиди.

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 24 C, D. Обратната тенденция, преминаването от $Sz4_2$ до Sz1 (случаят е показан на фиг. 24 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.

VI. 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.

III. Изводи

1. Установени са типа и честатота 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.

IV. 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.

V. Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд

Научни публикации във връзка с дисертационния труд

- **Rukova B**, Staneva R, Hadjidekova S, Stamenov G, Milanova V, Toncheva D – "Genome-wide methylation profiling of schizophrenia" – Balkan Journal of Medical Genetics, 2014, 17 (2), 15-24, DOI: 10.2478/bjmg-2014-0070
- **Blaga Rukova**, Rada Staneva, Savina Hadjidekova, Georgi Stamenov, Vihra Milanova & Draga Toncheva - Whole genome methylation analyses of schizophrenia patients before and after treatment, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014, 28:3, 518-524, DOI: 10.1080/13102818.2014.933501
- Sashka Krumova, **Blaga Rukova**, Svetla Todinova, Lidia Gartcheva, Vihra Milanova, Draga Toncheva, Stefka G. Taneva, Calorimetric monitoring of the serum proteome in schizophrenia patients, Thermochimica Acta, Volume 572, 20 November 2013, Pages 59-64, ISSN 0040-6031, http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2013.09.015.

Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд

- **B. Rukova** – „Proteome screening in sera of patients with schizophrenia at different stages and courses of drug therapy"- P09.214, ESHG 2011, Amsterdam, The Netherlands
- **B. Rukova** – „Determination of methylation profile in patients with schizophrenia", P11.118, ESHG 2012, Nürnberg, Germany
- **B. Rukova** – „Gender specific epigenetic profiles in patients with schizophrenia", P06.39, ESHG 2013, Paris, France
- **B. Rukova** – „Genome-wide methylation profiling of schizophrenia", P09.129-S, ESHG 2014, Milan, Italy
- **B. Rukova** – „Determination of methylation profile in patients with schizophrenia", 3477T, ASHG 2012, San Francisco, USA
- **B. Rukova** – „Epigenetic profiling of patients with schizophrenia" - Second Bulgarian-Japanese Symposium"Genomics in Medicine, 2012, Sofia, Bulgaria, oral presentation

- **B. Rukova** – „Determination of methylation profile in patients with schizophrenia“ - Second Bulgarian-Japanese Symposium”Genomics in Medicine” 2012, Sofia, Bulgaria, poster prsentation
- **B. Rukova** – „Calorimetric screening of the serum proteome in schizophrenia patients“, P4.1., EMPE Conference, Sofia, Bulgaria, 2012

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.

VI. Summary

Schizophrenia is one of the major psychiatric disorders. It is a disease of complex inheritance, involving both heritable and environmental factors. DNA methylation is an inheritable epigenetic modification that stably alters gene expression levels. Epigenetic and proteomic modifications vary during individual development and under the influence of environmental factors. We reasoned that genetic alterations that are a result of environmental stimuli could also make a contribution to the etiopathogenesis of schizophrenia.

In our study for the first time in Bulgaria we conducted a whole-genome methylation and proteome screening of Bulgarian patients with schizophrenia and healthy controls; we investigated the dynamics in methylation and proteomic profiles before and after administration of antipsychotic treatment. As a result, we have proposed several new candidate genes for schizophrenia mainly involved in synaptic transmission and nervous system development. The most likely candidate gene is *CASP3*, which plays an important role in the process of apoptosis and regulation of neurotransmission. We have found gender-specific differences - the most significant are methylation changes in *XIAP*, *GABRD*, *OXT* and *KRT7* genes in female patients. In male patients the strongest candidate genes are *DHX37*, *MAP2K2*, *FNDC4* and *GIPC1*. Our data support the hypothesis that different pathogenic mechanism may be contributing to the disease's development in men and women. Gender-specific differences have been revealed by analyzing the changes in methylation profiles after administration of antipsychotic treatment. As a result, we propose several genes as a potential new targets for future development of therapeutic agents - *C16orf70*, *CST3*, *DDRGK1*, *FA2H*, *FLJ30058*, *MFSD2B*, *RFX4*, *UBE2J1*, *ZNF311* and genes whose deregulation may be further investigated as probable markers for monitoring the effect of treatment - *AP1S3*, *C16orf59*, *KCNK15*, *LOC146336*, *MGC16384*, *XRN2*. These genes are mainly involved in regulation of transcription, ubiquitination and sphingolipids metabolism, RNA metabolism, protein transport and sorting.

Based on the thermodynamic properties of the blood serum we distinguished four calorimetric groups among patients with schizophrenia. Thermal stabilization of the high-abundance fraction of the serum proteome, suppression of the major and enhancement of the last high-temperature thermal transitions were found to be characteristic features of schizophrenia patients. The identification of those specific properties of the calorimetric profiles in

schizophrenia patients is expected to help the objective evaluation of the drug treatment in the future.

Our research shows that methylation and calorimetric analyses offer huge opportunities for a research on etiopathogenesis of multifactorial diseases. Studies on the epigenetic mechanisms involved in human diseases promises to further clarify elusive aspects of their etiology were as calorimetric profiling may help for more precise estimation of treatment success.