

**Molekulární aspekty bipolární poruchy a  
schizofrenie**

**AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

MUDr. Pavla Stopková  
Školitel: Prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc

Praha 2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci externího doktorského studia v biomedicině, oboru neurovědy, na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN Praha.

**Autorka:** MUDr. Pavla Stopková

**Pracoviště:** Psychiatrické centrum Praha

Ústavní 91

181 03 Praha 8

Telefon: 266003332

Fax: 266003361

email: [stopkova@pcp.lf3.cuni.cz](mailto:stopkova@pcp.lf3.cuni.cz)

**Obor:** Neurovědy

**Školitel:** Prof. MUDr. Petr Zvolský, DrSc

**Oponenti:**

**Autoreferát byl rozeslán dne:**

**Obhajoba se koná dne:**

S dizertační prací je možné se blíže seznámit na studijním oddělení děkanátu 1. LF UK, Kateřinská 32, Praha 2.

Prof.MUDr.Karel Šonka, DrSc., 1.LF Praha  
předseda oborové rady

## Poděkování

Chtěla bych s hlubokou úctou a vděčností poděkovat především svému školiteli, Prof. MUDr. Petru Zvolskému, DrSc, za mnohostrannou a neutuchající podporu, cenné rady a odborné vedení při práci na tomto projektu.

Velký dík patří Herbertu M. Lachmanovi, M.D., za jeho vstřícný dohled nad mojí prací a odborné vedení. Jeho nadšený, vynalézavý a poctivý přístup k vědecké práci podnítil můj zájem o výzkum v oblasti biologické psychiatrie, zejména o genetiku psychiatrických poruch, za což mu upřímně děkuji.

Dále velmi děkuji mým kolegům z Psychiatrické kliniky 1. LF UK a VFN, MUDr. Janu Veverovi, PhD, MUDr. Iljovi Žukovovi, CSc. a doc. MUDr. Ivo Pacltovi, CSc., za příjemnou a milou spolupráci v době vzniku této práce a za velké množství práce, které věnovali vzniku českého souboru pacientů s bipolární afektivní poruchou.

Mé vřelé díky patří Prof. MUDr. Cyrilu Höschlovi, DrSc., FRCPsych., řediteli Psychiatrického centra Praha, za podporu mojí práce a za vytvoření podmínek k dokončení postgraduálního studia.

Děkuji také všem spoluautorům jednotlivých studií a dále pak svým kolegům Psychiatrického centra Praha, kteří mi pomáhali při vzniku této práce i při dalších lékařských a odborných aktivitách.

V neposlední řadě děkuji mým nejbližším za jejich laskavou podporu, které se mi dostává nejen v letech postgraduálního studia.

## Obsah

1. Úvod
2. Cíle práce
3. Souhrn disertační práce
4. Studie č. 1: Skrining polymorfizmů *PIP5K2A* jako kandidátního genu pro psychiatrické poruchy s vazbou na chromozom 10p.
5. Studie č. 2: Skrining promoterové oblasti *PIP5K2A* u bipolární poruchy a schizofrenie.
6. Studie č. 3: Identifikace promoterové varianty *PIK3C3* asociované s bipolární poruchou a schizofrenií.
7. Studie č. 4: *PIK4CA* - kandidátní gen pro psychiatrické poruchy s vazbou na chromozom 22q11.
8. Studie č. 5: Analýza *SYNJI* jako kandidátního genu pro bipolární poruchu s vazbou na 21q22 – replikační studie.
9. Seznam publikací autorky
10. Summary of PhD thesis

## 1. Úvod

Bipolární afektivní porucha a schizofrenie patří mezi komplexní poruchy, s mírou dědičnosti kolem 80 %. Přenosu bipolární poruchy i schizofrenie v rodinách odpovídá nejlépe oligogenní nebo polygenní typ dědičnosti. Následuje přehled hlavních strategií detekce genů predisponujících k těmto nemocem.

**A. Chromozomální abnormality.** U bipolární poruchy ani schizofrenie není známa jednoznačná asociace s chromozomální aberací. U většího počtu jedinců byla nalezena translokace (1,11) a delece chromozomu 22q11, popisovaná jako velokardiofaciální syndrom. Obě chromozomální aberace jsou spojené s rozvojem bipolární poruchy i schizofrenie.

**B. Vazebné studie.** Vazebné studie hledají části chromozomů přenášejí se s nemocí v rodinách s postiženými členy. Srovnáním chromozomálních markerů u členů dané rodiny se určí genetická vazbu hledaného genu. Ke screeningu genomu stačí několik stovek markerů. K detekci genů středního nebo malého účinku, jaké se u bipolární poruchy a schizofrenie předpokládají, však mají studie vazby malou sílu a jsou obtížně replikovatelné. Přesahy oblastí chromozomů s replikovanými nálezy u bipolární poruchy a schizofrenie ukazují možnost společných predispozičních oblastí pro obě nemoci (Badner a Gershon, 2002).

**C. Studie genové exprese.** U schizofrenie jsou popsány tři hlavní oblasti změn genové exprese: downregulace klíčových genů pro myelinizaci a pro oligodendrocyty, změny exprese genů ovlivňujících presynaptickou a postsynaptickou funkci a genů kódujících metabolické enzymy (Katsel et al., 2005). U bipolární poruchy i schizofrenie byla zjištěna změna exprese genů se vztahem k myelinizaci (Tkachev et al, 2003).

**D. Asociační studie.** Asociační studie zjišťují, které alely se častěji vyskytují u pacientů ve srovnání s kontrolami. Podle typu zvolených kontrol se rozlišují studie populační a rodinné. Asociační studie jsou vhodné k detekci genů se středním a malým účinkem. K asociačním studiím se používají kandidátní geny nebo markery. U kandidátních genů funkčních se předpokládá pravděpodobná role v patogenezi onemocnění, kandidátní geny poziční se nalézají v oblastech s dříve určenou vazbou k poruše. Ke screeningu celého genomu je zapotřebí několika set tisíc markerů, proto se markery většinou používají v oblastech s vazbou k danému onemocnění.

**Poziční kandidátní geny pro bipolární poruchu a schizofrenii.** Konvergence pozitivních vazebných studií vedla k detailnímu mapování pozitivních oblastí a k nalezení specifických genů a objasnění jejich funkce. Tabulka 2 ukazuje míru dostupných důkazů u kandidátních genů pro schizofrenii a bipolární poruchu. Většinou byl predispoziční gen nejprve zaznamenán u schizofrenie a důkazy jsou také pro tuto nemoc nejvýraznější. Geny s nejlépe prokázaným vztahem k obou nemocem zároveň poskytují silné důkazy pro existenci genetických oblastí, které zvyšují predispozici přes rozhraní schizofrenie a bipolární poruchy.

**Funkční kandidátní geny.** Strategie funkčních kandidátních genů používá geny s předpokládaným funkčním významem pro danou poruchu. Nejvhodnější zdrojem funkčních kandidátních genů jsou neurotransmiterové systémy. Výsledky studií zaměřených na takové geny jsou však dosud nejednoznačné.

**Tabulka 2. Kandidátní geny pro bipolární poruchu a schizofrenii (podle Craddock et al., 2006a, upraveno).** Čím více +, tím více důkazů. Hodnocení je přibližné. Tučně – geny nejvíce implikované u obou poruch zároveň. (+) – nereplikované/ nekonzistentní. Zkratky: *PROD* –prolindehydrogenáza, *RGS4*-regulátor G-proteinové signalizace4, *NRG* -neuregulin1, *DISC1*-Disrupted in Schizofrenia1, *COMT*-catechol-O-methyltransferáza, *XBP1* – Human X box Binding Protein1, *5HTT* – serotoninový transportér

Gen	Umístění na chromozómu	Důkazy u schizofrenie	Důkazy u bipolární poruchy s psychózou	Důkazy u bipolární poruchy
<i>PROD</i>	22q11	(+)		
<i>RGS4</i>	1q23	++		
<b><i>Dysbindin</i></b>	6p22	+++++	+	+
<b><i>NRG 1</i></b>	8p12	++++	+	+
<b><i>DISC 1</i></b>	1q42	+++	++	+
<b><i>G72/G30</i></b>	13q33	++		++
<i>COMT</i>	22q11	+		+
<i>BDNF</i>	11p13	+		+
<i>XBP1</i>	22q12			(+)
<i>5HTT</i>	17q			(+)

## 2. Cíle práce

Vytyčili jsme si následující experimentální úkoly s cílem:

- Identifikovat mutace genu *fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza typ 2A (PIP5K2A)* a provést asociační studii v souboru pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií a v souboru odpovídajících kontrol.
- Analyzovat promoterovou oblast *PIP5K2A* na přítomnost mutací a provést asociační studii zjištěných polymorfizmů v souborech pacientů s bipolární poruchou, schizofrenií a v kontrolním souboru. Metodou EMSA zjistit, zda identifikované mutace mění vazbu na jaderné proteiny izolované z myšičích a lidských tkání.
- Skrínovat promoterovou oblast *fosfatidylinositol 3 kinázy typ C3 (PIK3C3)* na přítomnost mutací. Nalezené mutace genotypovat v asociační studii bipolárních, schizofrenních a kontrolních vzorků. Studovat pomocí EMSA, zda detekované polymorfizmy ovlivňují vazbu na jaderné proteiny izolované z myšičích a lidských tkání.
- Detekovat nové mutace v promoterové oblasti a části vlastního genu *fosfatidylinositol 4-kinázy (PIK4CA)* a provést předběžnou asociační studii porovnávající frekvenci alel identifikovaných mutací u kontrol a pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií.
- Replikovat asociační studii již dříve posaných mutací *synaptojaninu 1 (SYNJ1)* v novém souboru pacientů z České republiky, který byl vytvořen v letech 2001-2003 na Psychiatrické klinice v Praze.

### 3. Souhrn disertační práce

Disertační práce obsahuje výsledky populačních asociačních studií vybraných genů v souborech pacientů s bipolární afektivní poruchou, se schizofrenií a kontrol. Studované geny jsou součástí fosfoinositidové dráhy, která ovlivňuje přenos neuronálního signálu a řízení synaptického váčku. Tato dráha je pravděpodobným terapeutickým cílem působení lithia, léku účinného v léčbě bipolární poruchy. Mnohé geny této dráhy včetně genů námi studovaných se nacházejí na místech chromozomů se zjištěnou vazbou k bipolární poruše, ke schizofrenii nebo i k oběma poruchám zároveň.

První práce se týká genu *fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza typ 2A (PIP5K2A)*, která se podílí na syntéze fosfatidylinositol 4,5-bifosfátu, klíčového fosfolipidu řídicího přenosu signálu a pohyb synaptického váčku. Při skríningu polymorfizmů jsme poblíž „splice donor site“ exonu 9-intronu 9 identifikovali oblast s nedokonalým opakováním dinukleotidu CT. V distribuci alel této vysoce polymorfnní oblasti jsme našli mírný rozdíl při srovnání pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií s kontrolami. U pacientů se častěji vyskytovaly relativně vzácné, krátké varianty a homozygocita pro běžnou, dlouhou alelu byla častěji zjištěna u kontrol.

Druhá analýza se týká promoterové oblasti *PIP5K2A*. Identifikovali jsme vzácnou promoterovou mutaci -1007C→T. Tato mutace byla častěji nalezena u pacientů se schizofrenií oproti kontrolám a jediní dva homozygoté pro tuto variantu byli pacienti se schizofrenií. V souboru pacientů s bipolární poruchou nebyly rozdíly v distribuci této mutace zjištěny.

Druhým analyzovaným genem je *fosfatidylinositol 3 kináza typ C3 (PIK3C3)*. Při skríningu promoterové oblasti *PIK3C3* jsme našli variantu -432C→T, která se častěji vyskytovala v souborech pacientů s bipolární poruchou a se schizofrenií oproti kontrolám.

Čtvrtá práce je věnovaná *fosfatidylinositol 4-kináze (PIK4CA)*, která spolupracuje s *PIP5K2A* při syntéze fosfatidylinositol 4,5-bifosfátu. Skrínung dvou funkčních domén a promoterové oblasti *PIK4CA* vedl k identifikaci 15 různých polymorfizmů. Vzácné varianty byly nalezeny celkem u 3 pacientů s bipolární poruchou, u 3 pacientů se schizofrenií a pouze jedné kontroly. Identifikovali jsme také několik běžných, nesynonymních záměn a běžný SNP v předpokládané promoterové oblasti. Z těchto běžných polymorfizmů byl u pacientů s bipolární poruchou nalezen

mírný rozdíl v distribuci promoterového SNP s trendem ke statistické významnosti.

Poslední práce se týká *synaptojaninu 1 (SYNJI)*, inositol 5-fosfatázy, regulující recyklaci synaptického váčku. Výzkumný tým stejného pracoviště již dříve publikoval nález mutací *SYNJI*, které byly zjištěny buď častěji nebo výhradně u pacientů s bipolární poruchou. Naším záměrem bylo zopakovat analýzu *SYNJI* v novém souboru pacientů z České republiky, který byl vytvořen v letech 2001-2003 na Psychiatrické klinice v Praze. Nalezli jsme nárůst počtu homozygotů pro jednu variantu běžné mutace intronu 12, avšak tento nárůst nedosáhl statistické významnosti.

Obě výše popsané mutace, -432C→T u *PIK3C3* a -1007C→T u *PIP5K2A*, jsou podobné další promoterové mutaci (popsané dříve v jiné práci) -1898T→C u *SYNJI*. Ve všech případech se mutace vyskytuje uvnitř nebo poblíž motivu ATTT. Sekvence ATTT charakterizuje oblasti, na které se váží transkripční faktory Oct-1 a Brn-2. Tyto faktory patří do rodiny transkripčních faktorů POU, která reguluje genovou expresi během vývoje mozku a řídí postnatální fungování neuronů.

Kromě toho dvě z těchto variant, -432C→T u *PIK3C3* a -1007C→T u *PIP5K2A*, vedou ke vzniku palindromových sekvencí, které fungují jako vazebná místa pro proteiny řídicí transkripci. Promoterové varianty, které jsme identifikovali, mohou tedy vázat kromě členů rodiny POU i další transkripční faktory. Tuto možnost potvrzují výsledky našich experimentů, v kterých jsme u všech třech mutací prokázali metodou EMSA („Electromobility Gel Shift Assay“) zvýšenou vazbu proteinů izolovaných z myších a lidských mozků na alely s častějším výskytem u pacientů s bipolární poruchou a se schizofrenií.

V analýzách několika genů vybraných na základě jejich funkce a pozice na chromozomu jsme našli několik potenciálně funkčních mutací, které se mohou podílet na rozvoji bipolární poruchy a schizofrenie. Naše výsledky ukazují, že abnormální regulace genů fosfoinositidové dráhy může být podkladem rozvoje bipolární poruchy i schizofrenie. Tato hypotéza je v souladu s dosavadními znalostmi o patogenezi obou těchto nemocí, včetně terapeutického účinku lithia, předchozích genetických vazebných studií a řízení neurogeneze.

#### 4. Studie č. 1: Skrining polymorfizmů *PIP5K2A* jako kandidátního genu pro psychiatrické poruchy s vazbou na chromozom 10p

##### Úvod

Fosfoinositidová (PI) dráha je jedním z pravděpodobných cílů terapeutického působení lithia při léčbě bipolární afektivní poruchy (Obrázek 1). V terapeutických koncentracích je lithium účinným, nekompetitivním inhibítorem inositol monofosfatázy, která zajišťuje jeden z kroků postupné defosfylace inositolfosfátů na inositol (Hallcher a Sherman, 1980). Podle hypotézy deplece inositolu (Berridge and Irvine, 1989) může vést chronická léčba lithiem ke snížení hladiny inositolu v mozku, které dále vede k poklesu syntézy fosfatidylinositol 4,5-bifosfátu (PIP2) a poklesu přenosu signálu zprostředkovaného PI dráhou.

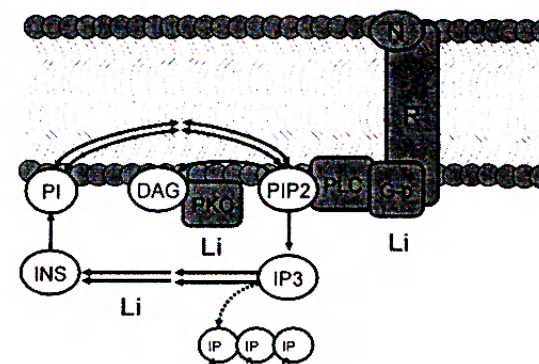
Inositol je prekurzorem fosfatidylinositol 4,5-bifosfátu (PIP2), hlavního membránového fosfolipidu, který ovlivňuje přenos signálu a pohyb synaptického váčku (Berridge and Irvine, 1989). Syntéza PIP2 je regulovaná specifickými lipidovými kinázami, které fosforylují fosfatidylinositol na pozicích D4 a D5 (Gehrmann and Heilmeyer, 1998).

Klasická funkční dráha PIP2 je zahájena jeho hydrolyzou fosfolipázou C (PLC) na druhé posly inositol 1,4,5-trifosfát, který mobilizuje intracelulární zásoby kalcia, a diacylglycerol, který aktivuje proteinkinázu C (Berridge and Irvine, 1989). PIP2 se váže přímo na proteiny na synaptických váčcích a dalších intracelulárních strukturách a tím hraje roli v regulaci pohybu synaptického váčku (Cremona et al., 1999). V neuronech ovlivňuje PIP2 fázi exocytózy i endocytózy cyklu synaptického váčku vazbou na synaptické proteiny (McPherson et al., 1996). Defosforylace PIP2 synaptojaninem vede k odstranění klathrinu z endocytovaného synaptického váčku, která umožňuje recyklaci synaptických vezikulů pro nové uvolnění transmiteru (McPherson et al., 1996; Cremona et al., 1999).

Lithium také zvyšuje koncentraci rozpustných inositolfosfátových meziproduktů vznikajících po ligandem aktivované hydrolyze PIP2 (Casebolt and Jope 1991; Lenox and Wang 2003). Lithium má také další účinky na fosfoinositidovou dráhu, a to inhibiční a excitační účinky na proteinkinázu C a inhibici

glykogen syntázkinázy, která je terčem fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátové signální dráhy (Jope and Bijur 2002).

Obrázek 1: Fosfoinositidová signální dráha



**Obrázek 1- legenda:** PI – fosfatidylinositol, PIP2 – fosfatidylinositol 4,5-bifosfát, IP3 – inositol 1,4,5-trifosfát, IP4 – inositol tetrafosfát, IP5 – inositol pentaosfát, IP6 – inositol hexaofosfát, INS – inositol, PKC – proteinkináza C, PLC – fosfolipáza C, G-p – G-proteiny, R – receptor, N – neurotransmitter. Li – cíle působení lithia.

Je zajímavé, že mnoho genů řídících metabolismus PIP2 i dalších fosfoinositidů a inositol 3-fosfátů a dalších inositolfosfátových druhých poslů se nachází poblíž oblasti chromozomu se zjištěnou vazbou k bipolární afektivní poruše a schizofrenii. Patří mezi ně také *PIP5K2A* – fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza, lokalizovaná v oblasti 10p12, v oblasti s vazbou k bipolární poruše a ke schizofrenii publikované v několika studiích (Rice et al., 1997, Maziade et al. 2001).

S ohledem na tato pozorování jsme se zaměřili na analýzu *PIP5K2A*, která je hojně exprimovaná v mozku. Fosfatidylinositol 5-kinázy katalyzují fosforylaci inositolového kruhu na pozici D5 za

použití fosfatidylinositolu nebo fosfatidylinositol 4-fosfátu jako substrátů a jsou zapojeny v přenosu signálu aktivovaném receptorem, funkci iontových kanálů a funkci synaptického váčku (Shyng et al., 2000).

## Metody

**Pacienti:** Pacienti byli nabíráni z klinik přidružených k Albert Einstein College of Medicine a z Psychiatrické kliniky Univerzity Karlovy v Praze. Diagnóza byla stanovena naplněním kritérií RDC (Spitzer et al., 1978) na základě interview SCID nebo SADS-L nebo pomocí klinického interview upraveného podle SADS-L. Pacienti podepsali informovaný souhlas schválený příslušnou etickou komisí. Kontrolní soubor byl tvořen anonymními dárci krve (USA, Česká republika), pacienty hospitalizovanými pro somatické potíže (Česká republika) a studenty a zaměstnanci nemocnice (Izrael, Česká republika). Kontrolní soubor z České republiky byl skrínován krátkým psychiatrickým interview na přítomnost psychiatrické nemoci. Soubory pacientů a kontrol si složením odpovídaly ve věku, pohlaví a etnickém původu. Sto osmnáct pacientů s bipolární poruchou, 96 se schizofrenií a 119 kontrol bylo ze Severní Ameriky evropského původu. Soubor schizofrenie se dále skládal z 80 pacientů se schizofrenií a 59 kontrol z Izraele. Bipolární skupina také zahrnovala 80 pacientů s bipolární poruchou a 93 kontrol z České republiky. Tyto bělošské vzorky byly spojeny se vzorky z USA, protože frekvence alel pro analyzované varianty byla v každé kohortě podobná.

**Detekce mutací a genotypování:** DNA byla izolována z celé krve pomocí izolačního kitu nebo standardní fenolovou extrakcí. V úvodním skríningu mutací bylo použito 24–45 vzorků DNA získaných od nepříbuzných pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií. Primery byly navrženy tak, aby byly amplifikovány exony a funkční domény na přechodech intronů a exonů. Fragmenty genomické DNA namnožené PCR byly skrínovány na přítomnost polymorfizmů pomocí modifikace analýzy „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) původně popsané Oritou et al (1989). Pro fragmenty PCR menší než 225 nukleotidů byl skrínung metodou SSCP proveden pomocí systému minigelu. U vzorků o přibližné délce 225–300 nukleotidů byla analýza SSCP provedena použitím standardního dlouhého sekvenovacího zařízení

s radioaktivně označeným produktem PCR. U většiny PRC produktů delších než 300 nukleotidů byly radioaktivně označené produkty PCR rozštěpeny vhodnou restriční endonukleázou (*HaeIII* a *BamHI*) a vzniklé menší produkty byly analyzovány na dlouhém sekvenovacím zařízení. U vzorků DNA s SSCP posunem pruhu byla provedena sekvenční analýza DNA na purifikovaných templátech PCR použitím fluorescenčně značeného dideoxy sekvenování. Byly sekvenovány oba řetězce DNA. V některých případech byla DNA namnožená pomocí PCR s unikátními alelami s opakováním dinukleotidů CT, subklonována, plasmidová DNA byla izolována a podrobena sekvenční analýze DNA. Všechny vzorky byly hodnoceny nezávisle dvěma výzkumníky.

**Počítačová analýza:** Sekvenční údaje byly porovnány s publikovanými sekvencemi pomocí BLASTN ze sítě BLAST. Identifikace mapování genů, které řídí fosfoinositolový a inositolfosfátový metabolismus byla provedena pomocí Human Genome Resources site na www stránce NCBI.

**Statistická analýza:** Asociace k polymorfizmům *PIP5K2A* byla testována pomocí Pearsonova  $\chi^2$  testu nebo Fisherova exaktního testu (tabulka 2×2 pro frekvenci alel). K analýze větších tabulek byl použit  $\chi^2$  test pro nezávislost (pro tabulky 3×2). K počítání  $\chi^2$  a hodnot *P* byl použit statistický program XSTAT. Všechny udávané hodnoty *P* jsou dvoustranné.

## Výsledky

**Předběžný skrínung *PIP5K2A*** zahrnoval analýzu exonů 2–10, které obsahují katalytickou doménu a vazebnou doménu pro fosfatidylinositol. Exon 1 a předpokládaná promoterová oblast nebyly skrínovány pro obtíže technického rázu. Identifikovali jsme 8 odlišných variant (Tabulka 2). Tři z toho byly synonymní změny (kodony 199, 309 a 391), jeden polymorfizmus v intronu 8 (IVS8 + 20C→G) a dva polymorfizmy v netranslatované oblasti 3'-konce (1257T→G a 1412G→C), které nebyly dále zkoumány. Další byla transice na kodonu 251 v exonu 7, která vedla nesynonymní záměně (N251S) již dříve identifikované (Schwab et al. 2001). Dále byla identifikována vysoce polymorfní oblast na 5'-konci intronu 9, poblíž „splice junction“ exonu 9 a intronu 9.

Schwab et al. (2001) publikoval signifikantní rozdíl v distribuci alely N251S u schizofrenie. Tento nálezn jsme však





B). Dále byl přítomen také mírně signifikantní rozdíl v distribuci alel mezi bipolárními pacienty a kontrolami při porovnání všech alel s počtem opakování menším než 29 s alelami většími než 29 opakování ( $X^2 = 4,46$ ,  $P = 0,03$ ). Stejná analýza u schizofrenních pacientů však nebyla signifikantní ( $X^2 = 0,02$ ,  $P = 0,83$ ).

**Tabulka 3A. Asociační studie polymorfizmu intronu 9 s různým počtem opakování CT. Distribuce alel intronu 9 s opakování CT. Počet jedinců a frekvence alel (v závorkách).**

	> 34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22
N = 212	36	128	31	65	156	4	1	3					
KONT	(0,08)	(0,30)	(0,07)	(0,15)	(0,37)	(0,01)		(0,01)					
N = 1982	26	103	23	59	169	9	1			1	1	2	
BP	(0,01)	(0,07)	(0,26)	(0,06)	(0,15)	(0,43)	(0,02)						
N = 1783	23	110	19	55	138	3	1	3				1	
KONT	(0,01)	(0,06)	(0,31)	(0,05)	(0,15)	(0,39)	(0,02)		(0,02)				
N = 1761	28	102	26	48	131	9	4				1	1	1
SZ	(0,08)	(0,29)	(0,07)	(0,14)	(0,37)	(0,03)	(0,01)						

**Tabulka 3B. Homozygoté pro polymorfizmus intronu 9 s různým počtem opakování CT. Distribuce alel s různým počtem opakování CT v intronu 9. Počty a frekvence homozygotů.**

	32/32	31/31	30/30	29/29
KONT	23 (0,11)	1 (< 0,01)	4 (0,02)	31 (0,15)
BP	12 (0,06)	1 (< 0,01)	6 (0,03)	32 (0,16)
KONT	17 (0,095)	1 (< 0,01)	5 (0,03)	26 (0,15)
SZ	10 (0,06)	1 (< 0,01)	3 (0,02)	25 (0,14)

Byl zjištěn trend ke statistické významnosti v počtu bipolárních pacientů, kteří byli homozygoté pro alelu s počtem opakování 32 (genotyp 32/32 ve srovnání se všemi ostatními genotypy, Fisherův test = 2,98,  $P = 0,08$ ). Výsledky u pacientů se schizofrenií byly obdobné, ale rozdíl těsně nedosáhl statistické významnosti (Fisherův test = 1,85,  $P = 0,16$ ). Test pro nestejné frekvence haplotypů vytvořené SNP exonu 7 a polymorfizmem

s různým počtem opakování intronu 9 u pacientů a kontrol nebyl signifikantní (data nejsou ukázána).

Tyto výsledky ukazují, že alely s malým počtem opakování odvozené z polymorfizmu s různým počtem opakování dinukleotidu CT v intronu 9 může způsobovat funkční změnu v expresi genu *PIP5K2A*, která přispívá k rozvoji bipolární poruchy a schizofrenie. Homozygotita pro běžnou alelu s počtem opakování 32 může snižovat riziko rozvoje bipolární poruchy. Jinou možností je, že alela s neúplným opakováním CT je ve vazebném disekvilibriu s jinou funkční mutací.

### Diskuse

Hypotéza deplece inositolu je zajímavá z mnoha aspektů, včetně vysvětlení specifity účinku lithia na náladu u pacientů s bipolární poruchou. Pro tento model však existují jen omezené experimentální důkazy (Jope et al., 1998; O'Donnell et al., 2003). Pozoruhodná je velmi malá vzdálenost některých genů fosfoinositidového nebo inositolfosfátového metabolismu k oblastem implikovaným u bipolární poruchy a schizofrenie. Příkladem je *PIK4CA* na chromozomu 22, deletovaném přibližně u 90 % pacientů s velokardiofaciálním syndromem, vrozené poruchy spojené s vysokou prevalencí psychiatrických poruch, dále *SYNJ1*, který je 1-2 megabáze od markerů na 21q22 s vazbou k bipolární poruše a schizofrenii v několika studiích, a *PIK3C3*, které se nachází několik centimorganů od markerů 18q12 s vazbou k bipolární poruše BD (Saito et al., 2001).

Mezi další geny fosfoinositidové dráhy, které se nacházejí poblíž těchto oblastí chromozomů, u kterých byla zjištěna vazba k bipolární afektivní poruše a schizofrenii, patří fosfatidylinositol transfer protein beta (22q12), *PIB5PA* – fosfatidylinositol 5-fosfatáza (22q11.2-13.2), *PIP5K2A* – fosfatidylinositol 4-fosfát 5-kináza (10p) a *PIK3C2B*, fosfatidylinositol 3-kináza (1q32) (Berrettini et al., 1994; Straub et al., 1994; Detera-Wadleigh et al., 1999; Lachman et al., 1997; Rice et al., 1997; Schwab et al., 2001; Straub et al., 1998; Faraone et al., 1998; Shaw et al., 1998; Brzustowicz et al., 2000; Foroud et al., 2000; Levinson et al., 2000; Maziade et al., 2001).

Také řada genů ovlivňujících metabolismus inositol 3-fosfátů a dalších inositolfosfátových druhů poslů se nachází velmi blízko oblastí s vazbou k bipolární poruše a schizofrenii. Mezi ně

patří *ITPKB*, inositol 1,4,5-trifosfátkináza (1q41), inositol 1,4,5-trifosfátkináza – *ITPKA* (15q14), *KIAA0274* – inositol 3-fosfatáza (6q22), synaptická inositol 1,4,5-trifosfát 5-fosfatáza (10q26), *SAC2*, inositolfosfatáza obsahující doménu Sac (10q26) a myoinositol monofosfatáza 2 (*IMPA2*) (18p11.2) (Levinson et al., 1998; Nurnberger and Foroud, 1999; Mowry et al., 2000; Yoshikawa et al., 2001; Ekelund et al., 2001; Tsuang et al., 2001; Ewald et al., 2002). Vzhledem k velkému počtu genů zapojených v metabolismu fosfoinositidů v mozku může však být jejich umístění poblíž oblastí s vazbou k duševním poruchám náhodným artefaktem.

Jedna z inositol 4-fosfatáz, *INPP4B*, se nachází blízko markeru na 4q, u kterého byla zjištěna vazba k ochraně před rozvojem bipolární poruchy u vysoce rizikových členů rodiny s bipolární poruchou (Ginns et al., 1998). Mutace v tomto genu může mít lithiu podobný účinek na inositolfosfátový metabolismus, kterým se vyvažuje predispozice způsobená pravděpodobně změnami fosfatidylinositidového a inositolfosfátového metabolismu zapříčiněnými bipolárními geny předávanými v rodině.

Hlavním výsledkem analýzy *PIP5K2A* byl nález vysoce polymorfní oblasti s nedokonalým opakováním dinukleotidu CT, která se nachází blízko „splice donor site“ exonu 9. Jednotlivé alely byly u pacientů ve srovnání s kontrolami nerovnoměrně rozděleny. U pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií jsme našli mírný nárůst v počtu jedinců s menším počtem opakování a pokles počtu homozygotů pro běžnou alelu s počtem 32 opakování. Tato oblast je tvořena rozsáhlým polypyrimidinovým traktem, jehož funkční význam není v současnosti znám. Polypyrimidinové trakty v délce 10-20 nukleotidů se většinou nacházejí na 3'-konci „splice acceptor site“, kde hrají roli v odstranění intronů z pre-mRNA a alternativním splicingu (Lou et al., 1999). Role polypyrimidinových traktů na „splice donor site“ však není známá. Sekvence CCCTC, která je součástí ústřední sekvence přítomné v alele s počtem 32, ale ne 29 opakování, vytváří vazebné místo pro CTFC, protein s mnoha funkcemi včetně represe transkripce, což ukazuje možnost, že exprese *PIP5K2A* by mohla být modulována terminací transkripce v intronu 9 (Perez-Juste et al., 2000).

V podskupině pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií zřejmě hrají roli společné genetické faktory, jak ukazují nálezy markerů na různých chromozomech s vazbou k oběma nemocemi

zároveň (Berrettini, 2000). Podle našeho modelu mohou být hlavním problémem u obou poruch alelické varianty genů ovlivňujících regulaci fosfoinositidových a inositolfosfátových druhých poslů. Pokud je tato hypotéza správná, je třeba vysvětlit dobrou responzivitu části pacientů s bipolární poruchou na lithium a špatnou odpověď na tento lék u pacientů se schizofrenií. Jednou z možností jsou genetické odlišnosti specifické pro obě poruchy, které se vzájemně ovlivňují s navrhovanou společnou poruchou fosfoinositidové dráhy a modifikují fenotyp a farmakologickou odpověď na lithium. Společný genetický a biochemický vývoj, který vysvětluje predispozici k bipolární poruše a zároveň ke schizofrenií, by měl důležité důsledky pro pochopení patogeneze těchto nemocí, vytvoření účinnější léčby a predikci dobré odpovědi na lithium. Konvergence genetických, biochemických a farmakologických nálezů popsanych v této práci svědčí o tom, že geny fosfoinositidového a inositolfosfátového metabolismu by měly být nahlíženy jako přijatelní kandidátní geny pro pravděpodobnou společnou genetickou predispozici k těmto poruchám.

## 5. Studie č. 2: Skrining promoterové oblasti PIP5K2A u bipolární poruchy a schizofrenie

### Úvod

V předchozích studiích naše skupina skrinovala 9 z 10 kódujících exonů *PIP5K2A* na přítomnost polymorfizmů u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií. Tato studie pokrývá exon 1 a částí předpokládané promoterové oblasti *PIP5K2A*, která jsme dříve neanalyzovali kvůli technickým problémům s amplifikací oblasti bohaté na CG.

### Metody

Pacienti: V této studii byly použity stejné soubory pacientů jako ve studii č. 1.

Detekce polymorfizmů a genotypování: K namnožení oblasti přiléhající k 5'-konci byly použity překrývající se primery. Namnožení analyzovaných oblastí bohatých na CG bylo dosaženo pomocí užití „enhancerového“ systému PCR podle instrukcí výrobce. Fragmenty genomické DNA namnožené PCR byly skrínovány na přítomnost polymorfizmů pomocí modifikace analýzy SSCP původně popsané Oritou et al (1989) a modifikované naším týmem. Pokud byl na SSCP detekován posun pruhu, byl vzorek namnožen a podroben sekvenční analýze DNA. Genotypy byly hodnoceny nezávisle dvěma výzkumníky.

Electromobility Gel Shift Assay (EMSA): EMSA byla prováděna podle publikovaného postupu (Hope et al., 1994). Byly vytvořeny dvouřetězcové oligonukleotidové próby obsahující mutovanou alelu promoteru *PIP5K2A*. Jaderný proteinový extrakt byl izolován z myši pomocí popsané techniky (Hope et al., 1994). Protein byl inkubován s próbou označenou <sup>32</sup>P a vzorky pak byly odděleny elektroforézou na nedenaturujícím gelu. Nenavázaný oligonukleotid migroval na konec gelu, migrace oligonukleotidu navázaného na protein byla zpomalena a byl pozorován posun pruhu. Specificita výsledné vazby byla prokázána kompeticí s radioaktivní a neradioaktivní próbou.

### Výsledky

Při skríningu *PIP5K2A* byl nalezen jeden SNP v promotoru 1, jde o synonymní změnu na kodonu 10 (TCT-TCG), která nebyla

dále analyzována, dále dvě varianty v oblasti pro5: – 1007, C→T (tgaacagatttccaC/Tggacgggtgagtgcac) a – 896T→C (Tabulka 1). Alela -896C byla nalezena pouze u 3 jedinců, u jednoho s bipolární poruchou, jednoho se schizofrenií a jedné kontroly. Analýza polymorfizmu -1007 ukázala vyšší frekvenci -1007T u pacientů se schizofrenií ve srovnání s kontrolami, výsledky však nedosáhly statistické významnosti (viz Tabulka 2). U pacientů s bipolární poruchou a kontrol nebyl zjištěn rozdíl. Pro -1007T byly nalezeni pouze dva homozygoté, oba byli pacienti se schizofrenií. Genotypy u schizofrenie se lišily od Hardy-Weinbergova ekvilibrria (P=0,02).

**Tabulka 1. Varianty promoterové oblasti - mutace jsou znázorněny velkými písmeny**

- a) -1007, C→T, od 5' k 3' konci: cagatttccaC/Tggacgggtgagt  
b) -896, T→C, od 5' k 3' konci: aagggtctcgaT/Cgaggtccgaggt

**Tabulka 2. Asociační studie varianty -1007, C→T**

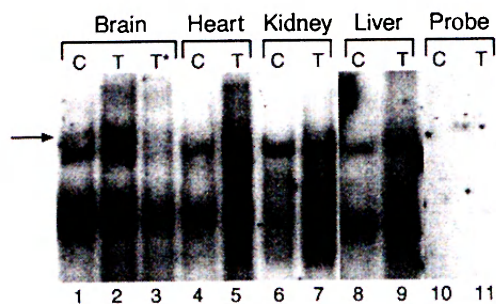
Počty osob s frekvencí v závorkách. Genotypy: schizofrenie – SZ: TT +CT versus CC:  $X^2=1,36$ ,  $P=0,24$ , alely:  $X^2=2,24$ ,  $P=0,13$ , bipolární porucha - BP: genotyp:  $X^2=0,32$ ,  $P=0,57$ ; alely:  $X^2=0,31$ ,  $P=0,58$ . Všechny výsledky jsou oboustranné.

	CC	CT	TT	C	T
Kontroly	115 (0,935)	8 (0,065)	0	238 (0,97)	8 (0,03)
SZ	118 (0,90)	12 (0,09)	2 (0,015)	248 (0,94)	16 (0,06)
Kontroly	212 (0,95)	12 (0,05)	0	436 (0,97)	12 (0,03)
BP	205 (0,96)	9 (0,04)	0	419 (0,98)	9 (0,02)

Alela – 1007T dává vznik palindromické sekvenci osmi nukleotidů (TCCATGGA), který může být cílem pro proteiny, které se váží na DNA. Alela -1007 dále vytváří místo, které ze 7/8 odpovídá hlavnímu vazebnému místu pro Oct-1, člena rodiny transkripčních faktorů POU (konsenzuální sekvence ATTTGCAT; Zhao et al., 2002). Ke zjištění, zda se mohou proteiny vázat na segment DNA obsahující polymorfizmus -1007, jsme užiteli metodu EMSA. Jak ukazuje Obrázek 1, při použití proteinu izolovaného z myšního mozku, ale ne z ostatních orgánů, byl nalezen posun pruhu, který je charakteristický pro komplex DNA-protein (šipka, sloupec 1

a 2). Mozkový jaderný protein se také preferenčně vázal na alelu -1007T (porovnání sloupců 1 a 2). Specificitu interakce mezi proteinem a DNA prokazuje vyblokování posunu pruhu při použití nadbytku radioaktivně neznačeného oligonukleotidu (sloupec 3). Běžný komplex DNA-protein je vidět ve všech tkáních (pruh pod signálem specifickým pro mozek), přesto není znát výrazný rozdíl v intenzitě signálu při použití obou alel.

**Obrázek 1: EMSA s použitím proteinového extraktu z myších tkání:** Sloupcy 1 a 2: Šipka označuje nárůst vazby proteinu na alelu -1007T. Sloupec 3 ukazuje specificitu vazebné aktivity T-alely prokázáním kompetice s neradioaktivní próbou ve stonásobném nadbytku (T\*). Sloupcy 4-9: Alela T neovlivnila vazbu na proteinové extrakty ze srdce, ledvin a jater, v tomto pořadí. Sloupcy 10 a 11: Oligonukleotidové próby.



## Diskuse

Významný vliv lithia na metabolismus fosfoinositidů a inositolfosfátů ukazuje, že geny zapojené v fosfoinositidové a inositolfosfátové dráze jsou možnými kandidáty pro dispozici k rozvoji bipolární poruchy. Mnoho genů řídících syntézu nebo defosforylaci PIP2, inositolfosfátů a dalších fosfoinositidů, se navíc nachází velmi blízko oblastí s vazbou k bipolární poruše a zároveň ke schizofrenii. Nálezy několika sdílených genetických oblastí u bipolární poruchy a schizofrenie ukazují, že mohou existovat genetické a biochemické dráhy společné pro obě poruchy, které interagují s genetickými faktory specifickými pro danou nemoc a vedou k rozvoji bipolární poruchy s rezistivitou na lithium,

bipolární poruchy rezistentní na lithium nebo k rozvoji schizofrenie. Takovou společnou dráhou může být například metabolická dráha fosfoinositidů a inositol fosfátů.

V předchozí studii jsme identifikovali polymorfismus s nedokonalým opakováním dinukleotidu CT v intronu 9, jehož krátké alely byly asociované s bipolární poruchou i schizofrenií BD. V současné analýze části 5'-oblasti jsme identifikovali dvě další mutace. Hlavním nálezem je nárůst v počtu alel -1007T u pacientů se schizofrenií ve srovnání s kontrolami. Rozdíl nebyl statisticky signifikantní, pravděpodobně pro malou velikost našeho souboru.

Ve studii však byli zjištěni pouze dva homozygoté, oba byli pacienti se schizofrenií. Vytvoření palindromu osmi bází, který odpovídá potenciálnímu vazebnému místu pro POU/Oct-1, a výsledky našich analýz EMSA ukazují, že záměna nukleotidu C za T na pozici -1007 vede ke změně funkce. Možná souvislost mezi alelou -1007T a schizofrenií, porovnaná s naším předchozím nálezem asociace mezi krátkými alelami intronu 9 s opakováním CT s bipolární poruchou i schizofrenií, naznačuje, že možná vazba transkripčního faktoru Oct-1/POU může být abnormálně regulována u schizofrenie, ale ne u bipolární poruchy. Tato představa je v souladu s neurodevelopmentálním modelem schizofrenie a s vývojovou expresí transkripčních faktorů POU. Výsledky této studie v kontextu našich předchozích studií a teoretických úvah o fosfoinositidové dráze podporují polymorfismus -1007 jako jednu z kandidátních alel pro podskupinu pacientů se schizofrenií a bipolární poruchou.

## 6. Studie č. 3: Identifikace promoterové varianty *PIK3C3* asociované s bipolární poruchou a schizofrenií

### Úvod

*PIK3C3* patří do rodiny fosfatidylinositol 3-kináz, které katalyzují fosforylaci PIP2 a dalších fosfatidylinositolových meziproduktů na pozici D3 a dávají tak vznik škále 3-fosforylovaných fosfatidylinositolových signálních molekul (Toker and Cantley 1997). 3-fosforylované inositidy se podílejí na řízení buněčného růstu, onkogenní transformaci a neuronálním přenosu signálu (Merlot and Firtel 2003). Lithium inhibuje glykogen syntázkinázu, která je aktivovaná fosfoinositol 3-kinázovou kaskádou (Jope and Bijur 2002). *PIK3C3* se nachází na chromozomu 18q12, asi 5cM od markerů s vazbou k bipolární poruše a také ke schizofrenii.

### Metoda

Pacienti: V této studii byly použity stejné soubory pacientů jako ve studii č. 1.

Detekce mutací a genotypování: K namnožení oblasti přiléhající k 5'-konci metodou PCR byly použity překrývající se primery. Fragmenty genomické DNA namnožené PCR byly skrínovány na přítomnost polymorfizmů pomocí modifikace analýzy SSCP původně popsané Oritou et al (1989). V počátečním skríningu bylo použito 30 vzorků DNA nepříbuzných pacientů s bipolární poruchou a 30 se schizofrenií. SSCP analýza byla provedena na standardním dlouhém sekvenovacím zařízení s radioaktivně označeným produktem PCR. Vzorky DNA s posunem pruhu na SSCP analýze byly pak purifikovány a sekvenovány fluorescenčně značeným dideoxy sekvenováním. Byly sekvenovány oba řetězce DNA. SNP -432 promoter 3 byl analyzován restričním štěpením enzymem *SwaI*, protože přítomnost SNP vytváří restriční místo pro *SwaI*. Genotyp byl hodnocen 2 výzkumníky. Varianta inzerce/delece -86 byla analyzována pyrosekvenátorem PSQ HS 96 podle postupu doporučeného výrobcem.

Electromobility Gel Shift Assay (EMSA): EMSA byla prováděna podle publikovaného postupu (Hope et al., 1994). Byly vytvořeny dvouřetězcové oligonukleotidové próby obsahující mutovanou alelu promoteru *PIK3C3*, další postup byl stejný jako

v předchozí studii. Všechny experimenty na myších tkáních byly zopakovány se třemi zvířaty. Experimenty na lidských mozcích byly provedeny na 4 vzorcích získaných ze dvou mozků. V experimentu se „supershiftem“ byla použita protilátka proti Oct-1, která zkříženě reaguje s lidským a hlodavčím proteinem Oct-1.

Statistická analýza: K počítání  $\chi^2$ , hodnot *P* a Fisherova testu byl použit statistický program XSTAT. Asociace byla testována buď pomocí Pearsonova  $\chi^2$  testu (tabulka 2x2). Všechny hodnoty *P* byly oboustranné. Hladina statistické významnosti byla nastavena na  $p < 0,05$ . Nebyly prováděny korekce na opakované testování.

### Výsledky

Byly nalezeny dva polymorfizmy, inzerce C na pozici -86 nukleotidů vzhledem k počátku místa translace ATG, a transice C→T na pozici -432 (Tabulka 2). Mutace -432C→T vytváří sekvenci ATTTAAAT palindrom 8 bází. Palindromy často představují místa pro proteiny, které se váží na DNA. Tento polymorfizmus také vytváří shodu 6/8 pro rozpoznávací místo pro faktory Oct-1 a Brn-2, členy rodiny transkripčních faktorů POU (konsenzuální sekvence ATTTGCAT).

V souboru z USA nebyl signifikantní rozdíl v distribuci alel mezi kontrolami a pacienty se schizofrenií a bipolární poruchou. Byl však přítomen nárůst počtu bipolárních pacientů, kteří byli homozygoté, ve srovnání s kontrolami (Tabulka 3). Také jsme analyzovali soubor bipolárních pacientů z České republiky. V této skupině jsme našli statisticky signifikantní rozdíl v distribuci alel, ačkoli byl počet homozygotů stejný (statistika viz Tabulka 3). Genotypy pacientů a kontrol byly v Hardy-Weinbergově ekvilibriu s výjimkou souboru bipolárních pacientů z USA, který se významně lišil ( $\chi^2=9,1$ ,  $p=0,003$ ). Statisticky signifikantní rozdíl byl také detekován v souboru pacientů z Izraele (statistika viz Tabulka 3). V obou hlavních poskupinách – Sefardské a Aškenazi - byl zaznamenán výrazný nárůst ve frekvenci alely -432T u pacientů se schizofrenií ve srovnání s kontrolami, a to i přes malou velikost souboru (viz Tabulka 3). Homozygoté nebyli nalezeni, což je v souladu s obecně nízkou frekvencí alely -432T u izraelských kontrol.

**Tabulka 2: Detekované promotorové polymorfizmy PIK3C:**  
Shoda s vazebným místem Oct-1/Brn-2/POU je uvedena tučně (**atttgc**at), polymorfizmus je velkým písmenem. Oktamerová homologie vytváří s alelou -432T palindrom o osmi bazích (podtržen). V nemutované alele -86 jsou podtrženy dva palindromy o 5 bazích “pantového” typu.

-86insC            ggaaccggaagttccgtgttggggctc  
                         ggaaccggaagtccCgtgttggggctc  
-432C→T           ggaatttaaaCctggcaaaatt  
                         ggaatttaaaTctggcaaaatt

**Tabulka 3. Asociační studie PIK3C3 -432 C->T SNP**

U.S.A	CC	CT	TT	C	T
KONT	0,80 (122)	0,19 (29)	0,013 (2)	0,89 (273)	0,11 (33)
BP	0,79 (107)	0,16 (22)	0,044 (6)	0,87 (236)	0,13 (34)
SZ	0,74 (96)	0,23 (30)	0,023 (3)	0,86 (222)	0,13 (36)

Zkratky: KONT–kontroly, BP–bipolární porucha, SZ–schizofrenie. TT vs CC+CT: BP vs KONT, Fisherův test=2,50, p=0,11; SZ vs KONT, Fisherův test=0,49, p=0,49. Frekvence alel BP vs KONT,  $\chi^2=0,46$ , p=0,50; SZ vs KONT,  $\chi^2=1,31$ , p=0,25. Všechny výsledky jsou oboustranné.

ČR	CC	CT	TT	C	T
KONT	0,82 (84)	0,17 (17)	0,02 (2)	0,90 (185)	0,10 (21)
BP	0,63 (52)	0,35 (29)	0,02 (2)	0,80 (133)	0,20 (33)

Zkratky: KONT – kontroly, BP – bipolární porucha. TT+CT vs CC: BP vs KONT u pacientů z České republiky, Fisherův test =8,36, p=0,004. Frekvence alel BP vs KONT,  $\chi^2=6,95$ , p=0,008.

IZR-ASK	CC	CT	TT	C	T
KONT	0,96 (46)	0,04 (2)	(0)	0,98 (94)	0,02 (2)
SZ	0,79 (38)	0,21 (10)	(0)	0,90 (86)	0,10 (10)

Zkratky: KONT – kontroly, SZ – schizofrenie. Frekvence alel SZ vs KONT v souboru Aškenazi Židů (AŠK) z Izraele, Fisherův test=5,67, p=0,02

ISR-SEF	CC	CT	TT	C	T
KONT	0,93 (38)	0,07 (3)	(0)	0,96 (79)	0,04 (3)
SZ	0,74 (56)	0,26 (20)	(0)	0,87 (132)	0,13 (20)

Zkratky: KONT – kontroly, SZ – schizofrenie. Frekvence alel SZ vs KONT v souboru sefardských Židů (SEF) z Izraele, Fisherův test =5,65, p=0,02. Sloučený soubor vzorků Židů Aškenazi a sefardských Židů SZ vs KONT, Fisherův test =12,81, p=0,0003

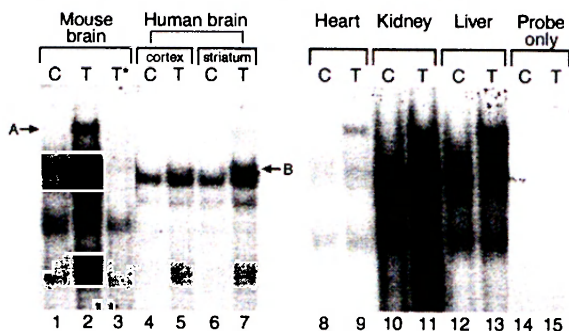
Dále jsme u 320 jedinců analyzovali promotorovou mutaci –86insC- Alela –86insC je v úplném vazebném disekvilibriu s mutací –432T ( $r^2=1,00$ ), a to v heterogenní bělošské populaci z USA i v etnicky homogennější skupině z České republiky (údaje nejsou uvedeny). Proto nebyl tento polymorfizmus analyzován v celém souboru vzorků.

K určení, zda se mohou proteiny vázat na fragmenty DNA obsahující polymorfizmy -432C→T a -86insC, jsme použili EMSA. Jak ukazuje Obrázek 1, byly detekovány posuny pruhů svědčící o komplexech DNA-protein při použití proteinů izolovaných z myšičího i lidského mozku a z dalších myšičích tkání. Výsledný vzor byl specifický pro jednotlivé alely. V myšičím mozku a dalších vzorcích myšičích tkání byl komplex DNA-protein nalezen při použití oligonukleotidu obsahujícího -432T, ale ne při užití -432C („A“ v Obrázku 1). V myšičím mozku, ledvinách a játrech bylo několik dalších komplexů DNA-protein. Tyto sice nebyly alelicky specifické, ale intenzita signálu byla větší při užití oligonukleotidu s -432T než s -432C, s výjimkou jater. V lidském mozku byl ve striatu při použití oligonukleotidu -432T přítomen unikátní komplex DNA-protein (pruh „B“). Běžný pruh nalézající se pod pruhem „B“ byl detekován při použití obou alel, ale intenzita signálu byla větší s -432T. Pro specifitu interakce mezi proteinem a DNA svědčí vyblokování vazby DNA na protein v příslušných pruzích pomocí nadbytku neznačeného oligonukleotidu (sloupec 3). Podobné výsledky jsme získali v lidské tkáni (údaje nejsou uvedeny).

Kvůli homologii vazebných míst pro transkripční faktory z rodiny POU jsme se pokusili o „supershift“ pruhů pomocí dostupných protilátek proti dvěma faktorům, Oct-1 a Oct-6. Protilátky specifické proti proteinům navázaným na DNA by dále zpomalily migraci komplexu DNA-protein a na autoradiogramu by se znázornily jako superposunutý pruh. Žádný „supershift“ jsme však nedetekovali (není ukázáno).

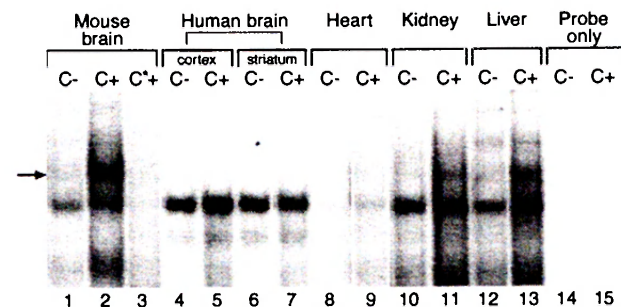
### Obrázek 1. Experiment EMSA s SNP -432.

Ve vazebné analýze byl použit protein izolovaný z celých myších mozků (1-3), lidský mozek (sloupce 4-7) a různých myších tkání – srdce, ledvin a jater (sloupce 8-13). Jednotlivé alely jsou označené nad sloupci. Sloupec 3 (T\*) ukazuje vazebný experiment, ve kterém byl použit 50 násobný přebytek neznačeného primeru s alelou -432T k blokování vzniku komplexu protein-DNA. Sloupce 14 a 15 jsou reakce sestavené bez proteinu. Komplex myšího proteinu – DNA detekovaný pouze s oligonukleotidem -432T je vyznačen šipkou A, komplex lidského proteinu – DNA je vyznačen šipkou B.



EMSA jsme použili také k analýze polymorfizmu -86insC. V tomto experimentu byla detekována velmi výrazná, alelicky specifická změna v intenzitě signálu při použití oligonukleotidu obsahujícího insert C ve srovnání s nemutovanou alelou (šipka v Obrázku 2). Signál byl přítomen v každé zkoumané myší tkáni, nejvýrazněji v mozku. Společný pruh byl vidět v myší i lidské tkáni s mírným nárůstem v lidském kortexu při užití oligonukleotidu s insertem C.

**Obrázek 2. Experiment EMSA s polymorfizmem -86insC.** Protein je stejný jako v Obrázku 1. C+ je oligonukleotid s insertem C, C- je oligonukleotid bez insertu. Sloupec 3 (C\*) je vazebný experiment, ve kterém byl použit 50-násobný přebytek neznačeného primeru k blokování vzniku komplexu protein-DNA.



SNP -432 je podobný dvěma dalším mutacím, které jsme již detekovali v promotorové oblasti dvou dalších fosfoinositidových genů, *SYNJ1* a *PIP5KCA*. Všechny částečně odpovídají oktameru vazebného místa pro Oct-1/Brn2/POU s motivem ATTT. *SYNJ1* -1898T→C se nachází v ústředním motivu ATTT a mění shodu s konsenzuálním oktamerem z 5/8 na 4/8. *PIP5KCA* -1007C→T zvyšuje počet bází v ústřední konsenzuální sekvenci z 6 na 7 (Tabulka 4). Homozygocita pro *PIP5K2A* -1007C→T byla původně nalezena u dvou pacientů se schizofrenií a u žádného pacienta s bipolární poruchou a žádného z kontrol, varianta *SYNJ1* -1898T→C byla zjištěna u jediného pacienta s bipolární poruchou (Saito et al, 2001). V obou případech, podobně jako v nálezech u *PIK3C3* -432C→T ukázaných v Obrázku 1, byla pro oba polymorfizmy zjištěna výrazná, alelicky specifická vazba na mozkový jaderný protein (viz Studie č. 2, nepublikované pozorování pro -1898T→C). Podobnost mezi těmito variantami nasvědčuje tomu, že změněná vazba k členům rodiny transkripčních faktorů POU může ovlivňovat expresi genů regulujících fosfoinositidovou dráhu a tak zvyšovat predispozici k rozvoji bipolární poruchy a schizofrenie v podskupině pacientů.

**Tabulka 4. Mutace *SYNJI* a *PIP5K2A* s homologií Oct-1/Brn-2**  
Konsensuální sekvence pro Oct-1/Brn-2 (**atttgc**at) je znázorněna tučně, varianty jsou velkými písmeny. Podtržen je palindrom 8 bází (atttccat) vytvořený alelou -1007T. Dále je podtržena konsensuální sekvence pro E-box transkripční faktory (canntg) v -1898.

*SYNJI* -1898T→C  
aagcaca**Tttgtt**gtga  
C  
*PIP5K2A* -1007C→T  
cag**atttcca**Cggacgg  
T

#### Diskuse

Polymorfizmus -432 C→T, identifikovaný v našem skríningu mutací *PIK3C3*, má u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií heterogenní a komplexní distribuci. V souboru pacientů z USA bylo homozygotních pro alelu -432T 4,4 % pacientů, ale jen 1,3 % kontrolních jedinců. Nebyl však zjištěn rozdíl v počtu heterozygotů a v celkové distribuci alel, ani nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi kontrolami a pacienty se schizofrenií. U bipolárního souboru z České republiky byl naopak zjištěn signifikantní nárůst v počtu heterozygotů ve srovnání s kontrolami bez změny frekvence homozygotů. Frekvence alely -432T byla vyšší v souboru bipolárních pacientů než v jiné analyzované skupině.

V souboru vzorků pacientů se schizofrenií z Izraele byl přítomen nárůst v počtu heterozygotů se schizofrenií ve srovnání s kontrolami z podskupin Aškenazi a Sefardů, ale velikost souboru byla po rozdělení vzorků z Izraele do dvou hlavních etnických skupin příliš malá, což zvyšuje riziko chyby typu I. Příčina signifikantního rozdílu v distribuci alely -432T u pacientů se schizofrenií byla v nízké frekvenci této alely u izraelských kontrol, frekvence alely -432T u pacientů se schizofrenií z Izraele byla jen mírně vyšší než frekvence u kontrol z USA. Pokud tyto údaje nejsou ovlivněné chybou typu I způsobenou populační stratifikací a malou velikostí souboru, nejjednodušší biologickou interpretací je, že až interakce jiných genů s polymorfizmem *PIK3C3* vede k rozvoji psychiatrických problémů, a že alelické varianty těchto genů nutné pro manifestaci psychiatrických obtíží jsou v různých etnických skupinách rozděleny nerovnoměrně.

Na výsledky analýzy genu *PIK3C3* je třeba pohlížet s opatrností vzhledem k vysoké míře zátěže asociačních studií psychiatrických poruch chybou typu I, obzvláště v heterogenní populaci z USA. Pro potvrzení výsledků bude nutné provést rodinné asociační analýzy rozsáhlé asociační studie v homogennější populaci s použitím genomických kontrol.

Naším nálezům však dodávají na váze výsledky studií EMSA a kontext našich předchozích studií, ve kterých jsme u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií identifikovali ve fosfoinositidových genech vzácné promoterové mutace, které výrazně připomínají SNP -432 *PIK3C3*. Ve všech případech se promoterová varianta vyskytuje uvnitř nebo poblíž motivu ATTT, který se nachází u transkripčních faktorů rodiny POU. Dvě z těchto alel, *PIK3C3* -432T a *PIP5K2A* -1007T, vytvářejí palindromy, které se často nacházejí jako ústřední rozpoznávací sekvence pro proteiny vážící DNA. Mutace *SYNJI*-1898 T→C nezasahuje palindrom, ale motiv ATTT se překrývá s konsensuální sekvencí pro transkripční faktory rodiny E-box a zároveň je podobný vazebnému místu pro POU. Promoterové varianty, které jsme identifikovali, mohou kromě členů rodiny POU vázat i další transkripční faktory.

Tuto možnost podporují naše experimenty EMSA, které u většiny analyzovaných promoterových variant ukazují četné posuny pruhů. Insert -86C, který je ve vazebném diskvilibriu s -432T, se nenachází v sekvenci konsensuální pro POU, ale uvnitř dvou pětibázových palindromů po obou stranách jediného nukleotidu.

Podle našich EMSA experimentů mají promoterové polymorfizmy častěji nacházené u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií výrazný vliv na vazbu jaderných proteinů izolovaných z mozku. Transkripční faktory rodiny POU jsou důležitými regulátory genové exprese během vývoje a několik z nich, hlavně proteiny Brn, hraje klíčovou úlohu při vývoji mozku (Latchman 1999). Mnoho genů exprimovaných v mozku, které jsou nezbytné pro vývojovou a povývojovou funkci neuronů, je ovlivněno proteiny POU, včetně *SNAP-25*, neurofilament, nikotinového receptoru a *Bcl-2* (Latchman 1999). Ztráta exprese jednotlivých členů rodiny POU u transgenních knockoutovaných myší má zásadní vliv na vývoj mozku (Latchman 1999).

V této diskuzi jsme se soustředili na SNP -432, protože zasahuje motiv ATTT. Pokud je však nález pozitivní asociace



skutečný, mohl by být způsobený další alelou ve vazebném disekvilibriu s -432T. Varianta -86insC, která je v úplném vazebném disekvilibriu s -432T, je také možným kandidátem, protože také ovlivňuje vazbu mozkových proteinů alelicky specifickým způsobem.

Možnost, že geny regulované transkripčními faktory POU by mohly být kandidáty pro predispozici k rozvoji bipolární poruchy a schizofrenie, je v souladu s dalšími molekulárními a genetickými nálezy. Na schizofrenii se nahlíží jako na neurovývojovou poruchu, která může být u geneticky predisponovaných jedinců způsobená např. prenatálním poškozením. Protože transkripční faktory rodiny POU hrají ve vývoji mozku i postnatálním fungování mozku nezastupitelnou roli, mohly by být geny ovlivňované transkripčními faktory POU spojkou vývojových a povývojových aspektů psychiatrických poruch. Roli POU faktorů v rozvoji schizofrenie dále podporuje nález zvýšení proteinu Oct-6 postmortem v mozcích pacientů ve srovnání s kontrolami (Ilia et al 2002).

Změny fosfatidylinositidového přenosu signálu se dobře doplňují s dalšími kandidátními geny identifikovanými u schizofrenie a bipolární poruchy, s *neuregulinem* 1 a s *GRK3* (Barrett et al 2003; Stefansson et al, 2003). *Neuregulin* je růstovým faktorem ovlivňujícím růst neuritu, migraci neuronů a apoptózu, který je spouštěn po aktivaci receptorů rodiny EGF/ErbB. Tyto receptory využívají fosfatidylinositol 3-kinázu ve své kaskádě přenosu signálu (Castellino a Chao 1999). V rozvoji bipolární poruchy může hrát roli promoterová mutace *GRK3*, člena rodiny kináz betaadrenergního receptoru, který se nachází na chromozomu 22q11 (Barrett et al, 2003). Kináza betaadrenergního receptoru spolupracuje s fosfatidylinositol 3-kinázou při koordinaci endocytózy receptoru závislé na klathrinu (Naga Prasad et al, 2002).

Naše výsledky ukazují, že abnormální regulace fosfoinositidových genů, například transkripčními faktory rodiny POU, může být etiologickým podkladem rozvoje bipolární poruchy a schizofrenie. Tato hypotéza dobře odpovídá různým aspektům patogeneze schizofrenie a bipolární poruchy, včetně terapeutického účinku lithia, studií genetické vazby, nedávno identifikovaných kandidátních genů a poznatkům o vývoji nervového systému.

## 7. Studie č. 4: *PIK4CA* - kandidátní gen pro psychiatrické poruchy s vazbou na chromozom 22q11.

### Úvod

Fosfatidylinositol 4-kináza (*PIK4CA*) katalyzuje první krok fosforylace při syntéze PIP2. *PIK4CA* je kódována na chromozomu 22q11, v oblasti implikované v rozvoji bipolární poruchy a schizofrenie v několika vazebných studiích (Pulver et al., 1994; Lachman et al., 1997). Vztah oblasti 22q11 k duševním poruchám podporují také studie velokardiofaciálního syndromu (VCFS), vrozené poruchy způsobené mikrodeleci 22q11, spojené s vysokým výskytem psychiatrických poruch (Papolos et al., 1996). Fosfatidylinositol 4-kinázy se mimo jiné nacházejí na malých synaptických vezikulech a mají vliv na uvolňování transmiterů, regulují retrogradní transport nervového růstového faktoru a hrají roli v endocytóze receptorů (Reynolds et al., 1999). V této studii jsme skrinovali část genu *PIK4CA* na přítomnost polymorfizmů a provedli jsme předběžnou asociační studii srovnání frekvence alel polymorfních variant u kontrol a pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií.

### Metody

Pacienti: Pacienti s bipolární poruchou a schizofrenií byli diagnostikováni buď na základě SADS-L interview nebo pomocí nestrukturovaného klinického interview upraveného podle SADS-L podle kritérií RDC (Spitzer et al., 1978). Pacienti byli nabíráni z klinik a ordinací přidružených k Albert Einstein College of Medicine a Bronx Psychiatric Center. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas schválený odpovídající Etickou komisí. Kontrolní skupinu tvořili anonymní dárci krve bez provedení skrínungu přítomnosti psychiatrické poruchy. Všichni pacienti a kontroly byly bělošského původu.

Detekce mutací a genotypování: DNA byla izolována z celé krve buď pomocí izolačního kitu nebo standardní fenolovou extrakcí. Primery byly připraveny na základě intronových sekvencí tak, aby docházelo k amplifikaci exonů, přechodů exon-intron a oblasti přiléhající k 5'-konci. Fragmenty genomové DNA namnožené pomocí PCR byly skrínovány pro polymorfizmy pomocí modifikace analýzy SSCP (Orita et al., 1989). Pro skrínung polymorfizmů bylo

použito 24-45 vzorků DNA získaných od nepříbuzných pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií. Pro fragmenty PCR menší než 225 nukleotidů byl skrínig metodou SSCP proveden pomocí systému minigelu. U vzorků o přibližné délce 225-300 nukleotidů byla analýza SSCP provedena použitím standardního dlouhého sekvenovacího zařízení s radioaktivně označeným produktem PCR. U většiny PRC produktů delších než 300 nukleotidů byly radioaktivně označené produkty PCR rozštěpeny vhodnou restriční endonukleázou (*HaeIII*, *BamHI*) a vzniklé menší produkty byly analyzovány na dlouhém sekvenovacím zařízení. U vzorků DNA s SSCP posunem pruhu byla po purifikaci provedena sekvenční analýza DNA. Analýzou SSCP byly vyhodnoceny všechny vzorky. Hodnocení bylo prováděno nezávisle dvěma výzkumníky.

Počítačová analýza: Sekvenční údaje byly porovnány s publikovanými sekvencemi pomocí BLASTN ze sítě BLAST při National Center for Biotechnology Information. K identifikaci možných míst pro vazbu proteinů na DNA byly použity programy MatInspector V2.250 a TFSEARCH.

Statistická analýza: Asociace SNP *PI4KCA* byla testována pomocí Pearsonova  $\chi^2$  test (tabulka 2×2 pro frekvenci alel) a  $\chi^2$  testu pro nezávislost (tabulka 3×2 pro genotypy). Ke spočítání hodnot  $\chi^2$  byl použit statistický program StatXact-3. Všechny udávané hodnoty *P* jsou dvoustranné.

### Výsledky

Skrínovali jsme předpokládanou 5'-promoterovou oblast *PIK4CA* a 20 distálních exonů, které kódují katalytickou doménu a plekstrinovou homologii. Celkem bylo identifikováno 15 polymorfizmů v 21 analyzovaných amplimerech (Tabulka 1).

V celém souboru vzorků jsme analyzovali všechny promoterové varianty a dále polymorfizmy, které jsme na základě analýzy sekvence DNA považovali s velkou pravděpodobností za funkčně signifikantní. Také jsme analyzovali nefunkční polymorfizmy, pokud se nacházely ve stejném amplimeru jako potenciálně funkční varianty (mohly být snadno hodnoceny na stejném gelu). Varianta v intronu 55 (-12G→A) nebyla dále analyzovaná, protože žádná alela neměnila obsah pyrimidinů. Konzervativní polymorfizmy také nebyly dále zkoumány.

**Tabulka 1. Polymorfizmy detekované v genu *PIK4CA***

Set primerů	Polymorfizmus
prol	-31A → G
prol	-38C → T
prol	AGC → AGT kodon 12 (synonymní změna)
exon 48	E2079Q
exon 48	IVS47-22G → C
exon 49/50	I2110V (konzervativní změna)
exon 49/50	GAG → GAA kodon 2104 (synonymní změna)
exon 52	ACT → ACC kodon 2252 (synonymní změna)
exon 52	IVS52 + 4A → G
exon 54	GGT → GGC kodon 2292 (synonymní změna)
exon 54	R2259C
exon 55	GGC → GGG kodon 2300 (synonymní změna)
exon 56	IVS55-12G → A PPT purin → purin
exon 56	V2356A (konzervativní změna)
exon 56	GAT → GAC kodon 2355 (synonymní změna)

Na základě těchto rozhodnutí bylo v celém souboru vzorků analyzováno 11 polymorfizmů, z nich 5 bylo velmi vzácných (viz Tabulka 2). Z těchto jsou nejpravděpodobněji funkčně signifikantní -38C→T a IVS52 + 4A→G. Polymorfizmus IVS52 vede k vytvoření „splice donor site“, ve kterém se 2 baze liší od konsenzuálního „splice donor site“ o 8 bazích (Ketterling et al., 1999). Polymorfizmus -38T vytváří shodu 7/8 pro rodinu faktorů vážících se na cAMP (CREB). Frekvence vzácných variant u pacientů se schizofrenií, bipolární poruchou a kontrol je uvedena v Tabulce 2.

Tři z variant, které jsme našli, byly běžné SNP, které mohou být funkčně signifikantní. Mezi tyto patří promoterový polymorfizmus -31A → G a varianty E2079Q a R2259C. Analýza těchto variant v celém souboru dat neukázala signifikantní rozdíl v distribuci alel u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií ve srovnání s kontrolami (Tabulka 4). V distribuci promoterové varianty na pozici -31 byl však nalezen trend k statistické

významnosti u bipolárních pacientů, a to při porovnání homozygotů pro wild alelu se všemi ostatními genotypy (statistika viz Tabulka 4). Ačkoli pacienti se schizofrenií měli stejnou frekvenci -31A jako pacienti s bipolární poruchou, porovnání s kontrolami nebylo signifikantní kvůli menší velikosti souboru (statistika viz Tabulka 4).

**Tabulka 2. Frekvence vzácných variant *PIK4CA***

		KONT	BP	SZ
Pravděpodobně funkční				
prol	-38C → T	0/134	1/133	0/100
exon 52	IVS52(+4A → G)	1/121	2/124	3/96
Pravděpodobně nefunkční				
prol	AGC → AGT kodon 12, synonymní	6/134	6/133	3/100
exon 48	IVS47(-22G → C)	1/122	1/124	0/95
exon 52	ACT → ACC kodon 2252, synonymní	1/121	1/124	0/96

**Tabulka 2 - legenda:** Frekvence polymorfizmů je rozdělena na základě sekvence DNA na polymorfizmy potenciálně funkční a pravděpodobně nefunkční (podrobnosti viz Výsledky). KONT - kontroly; BP - bipolární porucha; SZ - schizofrenie.

**Tabulka 4. Frekvence polymorfizmů**

	Kontroly	BP	SZ
-31(A → G)			
AA	57 (0,43)	70 (0,53)	52 (0,52)
AG	65 (0,48)	53 (0,40)	40 (0,40)
GG	11 (0,08)	9 (0,07)	8 (0,08)
A	179 (0,67)	193 (0,73)	144 (0,72)
G	87 (0,33)	71 (0,27)	56 (0,28)
E2079Q			
1,1	67 (0,55)	73 (0,59)	49 (0,52)
1,2	47 (0,39)	46 (0,37)	43 (0,46)
2,2	8 (0,07)	5 (0,04)	2 (0,02)
1	181 (0,74)	192 (0,77)	141 (0,75)

2	63 (0,26)	56 (0,23)	47 (0,25)
R2259C			
1,1	73 (0,52)	79 (0,58)	60 (0,60)
1,2	62 (0,44)	55 (0,40)	39 (0,39)
2,2	6 (0,04)	3 (0,02)	1 (0,01)
1	208 (0,74)	213 (0,78)	159 (0,80)
2	74 (0,26)	61 (0,22)	41 (0,21)

**Tabulka 4 - legenda:** Distribuce genotypů promotorového SNP -31 a nesynonymní varianty E2079Q (alela 1 je 2079E a alela 2 je 2079Q) a R2259C (alela 1 je 2259R a alela 2 je 2259C). U alel SNP -31, BP vs kontroly,  $P=0,144$ ,  $\chi^2=2,14$ ; genotypy,  $P=0,25$ ,  $\chi^2=2,75$ , genotyp 1.1 vs 1.2 + 2.2,  $P=0,097$ ,  $\chi^2=2,75$ ; SZ vs kontroly, alely  $P=0,28$ ,  $\chi^2=1,19$ ; genotypy,  $P=0,36$ ,  $\chi^2=2,02$ . U E2079Q, BP vs kontroly,  $P=0,4$ ,  $\chi^2=0,70$ ; genotypy,  $P=0,62$ ,  $\chi^2=0,94$ ; SZ vs kontroly, alely  $P=0,85$ ,  $\chi^2=0,038$ ; genotypy,  $P=0,22$ ,  $\chi^2=2,99$ . U R2259C, BP vs kontroly,  $P=0,27$ ,  $\chi^2=1,20$ ; genotypy,  $P=0,45$ ,  $\chi^2=1,60$ ; SZ vs kontroly, alely  $P=0,15$ ,  $\chi^2=2,12$ ; genotypy (spojené 1.1 vs 1.2 + 2.2,  $P=0,21$ ,  $\chi^2=1,60$ ).

## Diskuse

V naší současné studii jsme se věnovali skrínungu polymorfizmů části genu *PIK4CA*, a to jeho předpokládané promoterové oblasti a 3'-konce, který obsahuje katalytickou doménu. Nenalezli jsme žádnou variantu *PIK4CA*, která by byla jednoznačně asociovaná s bipolární poruchou nebo schizofrenií, identifikovali jsme ale dvě vzácné varianty vyskytující se převážně u pacientů s bipolární poruchou a schizofrenií. Tyto varianty mohou být funkčně signifikantní. Jednou z nich je IVS52+4A → G, která by mohla narušovat splicing exonů a intronů. Druhou variantou je -38C → T, která se nachází v promoterové oblasti. Tato mutace by mohla vytvářet možnou vazebnou doménu pro transkripční faktory rodiny CREB.

Kromě těchto vzácných alel byla na pozici -31 v předpokládané promoterové oblasti identifikována polymorfnní varianta neznámé funkce. U bipolárních pacientů byl pro tuto mutaci zjištěn trend ke statistické významnosti. Žádná z alel A nebo G nevede k vytvoření vazebného místa ke známých faktorům.

Vzhledem k blízkosti místa počátku translace a mírně nalezené asociaci bude na místě dále zkoumat její možnou funkci.

Přestože jsou výsledky analýzy *PIK4CA* poměrně skromné, jsou v souladu s výsledky, které se očekávají při analýze komplexních psychiatrických fenotypů v relativně malých souborech jedinců, jaké jsme měli k dispozici. Nepříliš signifikantní nálezy mohou být také vysvětleny stratifikační chybou, a hlavně vzhledem k heterogenitě analyzované populace. Další možností je falešná pozitivita našich výsledků jako následek artefaktu vzniklého při opakovaném testování. Kromě možnosti statistické chyby typu I a II patří mezi další omezení této studie analýza pouze třetiny kódující oblasti. V současné databázi SNP je možné v 5'-oblasti *PIK4CA* najít několik sekvenčních variant. Tyto varianty budou předmětem dalšího zkoumání v dalších studiích.

## 8. Studie č. 5: Analýza *SYNJI* jako kandidátního genu pro bipolární poruchu s vazbou na 21q22 – replikační studie

### Úvod

Synaptojanin 1 je inositol 5-fosfatáza exprimovaná v synaptických zakončeních, která defosforyluje PIP2 a fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát na 5. pozici inositolového kruhu a tím se podílí na řízení funkce synaptického vezikulu (McPherson et al., 1996). *SYNJI*, kódující synaptojanin, se nachází na chromozomu 21q22.2 v oblasti vzdálené 2.4–11.6 miliónů nukleotidů od markerů s vazbou k bipolární poruše, zjištěnou v několika různých studiích (Straub et al., 1994; Cremona et al., 2000). Předchozí analýza *SYNJI* v naší laboratoři odhalila 11 mutací. Tyto mutace byly nalezeny pouze u pacientů s bipolární poruchou a v distribuci alel byl zjištěn trend k signifikaci (Saito et al., 2001). Provedli jsme replikační studii v novém souboru českých pacientů s bipolární poruchou.

### Metody

**Pacienti:** Navzájem nepříbuzní pacienti ( $N=81$ ) byli nabíráni z Psychiatrické kliniky I. LF UK v Praze. Diagnóza bipolární poruchy typu I nebo II byla stanovena na základě strukturovaného klinického interview Mini International Neuropsychiatric Interview a pomocí klinického interview upraveného podle SADS-L. Kontrolní skupinu ( $N=102$ ) tvořili pacienti hospitalizovaní na interním oddělení fakultní nemocnice I. LF UK, dobrovolní dárci krve a zaměstnanci I. LF UK. Všechny kontroly byly skrínovány na přítomnost psychiatrické poruchy pomocí krátkého psychiatrického interview. Všichni pacienti a kontroly byli běloši a občané České republiky a podepsali informovaný souhlas schválený etickou komisí.

**Detekce polymorfizmů a genotypování:** DNA byla izolována z celé krve pomocí izolačního kitu. K amplifikaci exonů 1, 7, 12 a části oblasti přiléhající k 5'-konci *SYNJI* byly navrženy přerývající se primery. Vzorky byly genotypovány pomocí modifikace SSCP analýzy.

**Statistická analýza:** K počítání  $\chi^2$  a hodnot  $P$  byl použit statistický program XSTAT. Asociace k polymorfizmům *SYNJI* byla testována pomocí Pearsonova  $\chi^2$  testu (tabulka  $2 \times 2$  pro frekvenci alel) a  $\chi^2$  testu pro nezávislost (pro tabulky  $3 \times 2$ ).

## Výsledky

Při předchozím skriningu všech kódujících exonů a části oblasti přilehlé k 5' - konci u pacientů s bipolární poruchou ve stejné laboratoři bylo nalezeno 11 mutací, z nichž 4 byly analyzovány v celém souboru vzorků. U varianty zjištěné v intronu 12 byl nalezen trend k významnosti v distribuci alel mezi pacienty s bipolární poruchou a schizofrenií (Saito et al., 2001). Tyto varianty byly analyzovány v nové skupině pacientů.

Mezi vzácné varianty, které byly ve stejné laboratoři již dříve identifikovány, patří -1898T→C, IVS1+58C→A, IVS6-49G→A a IVS7+43G. V původní studii pacientů s bipolární poruchou byl identifikován pouze 1 pacient s -1898C a jeden s IVS1+58A, a stejný počet kontrol. Varianta IVS6-49A byla nalezena u dvou pacientů s bipolární poruchou a u žádné kontroly, IVS7+43G byla zjištěna u 6 pacientů s bipolární poruchou a 5 kontrol. U českém souboru 84 pacientů s bipolární poruchou však žádná z těchto variant nebyla zjištěna.

Polymorfismus intronu 12 (IVS12+15delT,+17delT) vede ke ztrátě dvou thymidinových nukleotidů v polyAT úseku. V původní analýze byl zjištěn mírný nárůst alely 2 u pacientů s bipolární poruchou, který těsně nebyl statisticky signifikantní. Variantu intronu 12 jsme genotypovali u 84 českých bipolárních vzorků a 105 odpovídajících kontrol (Tabulka 2). Výsledky nebyly statisticky signifikantní, i když byl podobně jako v předchozí studii přítomen nárůst homozygotů pro alelu 2 (statistika viz Tabulka 2). Rozdělení kontrolních a bipolárních genotypů se neodchylovalo od předpokládaného Hardy–Weinbergova ekvilibria. Při sloučení údajů z obou souborů byl stále přítomen trend ke statistické významnosti pro homozygoty 2/2 (statistika viz Tabulka 2).

## Diskuse

Předchozí analýza *SYNJ1* ve stejné laboratoři byla provedena v souboru 149 bělošských jedinců s bipolární poruchou ze Spojených Států. Tato analýza odhalila několik vzácných a běžných mutací, z nichž některé mohou mít funkční význam. Současná studie byla zaměřena na replikaci těchto výsledků v novém souboru 84 pacientů s bipolární poruchou pocházejících z homogennější populace v České republice. V analýze 84 bipolárních jedinců nebyla

detekována žádná se tří vzácných alel původně nalezených pomocí setů primerů pro exony 1 a 7 a pro oblast přilehlou k 5'-konci. Pro běžnou mutaci intronu 12 nebyl rozdíl ve frekvenci alel mezi kontrolami a pacienty s bipolární poruchou signifikantní. V českém souboru však byl podobně jako v původní práci zjištěn nárůst v počtu 2/2 homozygotů.

To, že se výsledky nepodařilo v českých vzorcích zopakovat, může mít několik příčin. Zaprvé jsme mohli neuspět v odhalení vzácných mutací kvůli malé velikosti souboru. Relativně malá velikost souboru může také vysvětlovat nedostatek signifikantního rozdílu ve frekvenci alel u polymorfismu intronu 12. Zadruhé, soubor pochází z jiné populace, ve které může být predispozice k rozvoji bipolární poruchy podložena odlišným souborem genů než v původních vzorcích z USA. Zatřetí je možné, že *SYNJ1* přispívá k predispozici k bipolární poruše pouze unikátními vzácnými mutacemi, které jsou specifické pro jednotlivé rodiny. V tom případě by kompletní analýza genu *SYNJ1* v českém souboru mohla identifikovat vzácné mutace, které jsou jedinečné pro několik rodin v této populaci.

**Tabulka 2. Asociační studie polymorfismu intronu 12**  
Genotypy a alely pro polymorfismus exonu 12 – údaje českého a sloučeného souboru českých a amerických vzorků. Počty jedinců s každým genotypem a počet alel jsou uvedeny s frekvencí v závorkách. (český soubor: frekvence alel  $\chi^2=0,16$ ,  $P=0,69$ , genotypy  $\chi^2=1,06$ ,  $P=0,59$ . Sloučený soubor: frekvence alel  $\chi^2=2,05$ ,  $P=0,15$ , genotypy  $\chi^2=1,06$ ,  $P=0,29$ , homozygoté 2/2 vs. všechny ostatní genotypy:  $\chi^2=2,27$ ,  $P=0,13$ ).

Genotypy	Český soubor		Sloučený soubor	
	Kontroly	BP	Kontroly	BP
11	23 (0,23)	18 (0,22)	73 (0,29)	58 (0,25)
12	53 (0,52)	37 (0,46)	119 (0,48)	104 (0,45)
22	26 (0,25)	26 (0,32)	58 (0,23)	67 (0,29)
Alely				
1	76 (0,49)	55 (0,466)	242 (0,536)	202 (0,487)
2	79 (0,509)	63 (0,533)	209 (0,463)	212 (0,512)

## 9. Seznam publikací autorky

### A. Publikace in extenso s impakt faktorem, vztahující se k předkládané disertační práci:

**Stopkova P**, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Papolos DF, Saito T., Lachman HM. Screening of *PIP5K2A* promoter region for mutations in bipolar disorder and schizofrenia. *Psychiatr Genet.* 2005 Sep;15(3):223-7. **IF 2.366**

**Stopkova P**, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Lachman HM. Analysis of *SYNJ1*, a candidate gene for 21q22 linked bipolar disorder: A replication study. *Psychiatry Res.* 2004 Jun 30;127(1-2):157-61. **IF 1.989**

**Stopkova P**, Saito T, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Papolos DF, Bersson YB, Margolis BA, Strous RD, Lachman HM. *PIK3C3* promoter variant in psychiatric disorders. *Biol Psych.* 2004 May 15;55(10):981-8. **IF 6.159**

**Stopkova P**, Saito T, Fann CSJ, Papolos DF, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Stryjer R, Strous RD, Lachman HM. Polymorphism screening of *PIP5K2A*: A candidate gene for chromosome 10p-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet. Part B: Neuropsych Genetics* 2003 Nov 15;123B(1):50-8. **IF 2.603**

Saito T, **Stopkova P**, Diaz L, Papolos DF, Boussemart L, Lachman HM. Polymorphism screening of *PIK4CA*: Possible candidate gene for chromosome 22q11-linked psychiatric disorders. *Am J Med Genet. Part B: Neuropsych Genetics* 2003 Jan 1;116 (Suppl. 1):77-83. **IF 2.603**

### B. Abstrakty přednášek a posterů, vztahující se k předkládané disertační práci:

**Stopková P**, Vevera J, Žukov I, Paclt I, Lachman HM. Model patogeneze bipolární afektivní poruchy a schizofrenie na základě analýzy genů fosfoinositidové signální dráhy. 46. česko-slovenská neuropsychofarmakologická konference, leden 2004. Poster.

**Stopkova P**, Saito T, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Strous RD, Lachman HM. Identification of *PIK3C3* and *PIP5K2A* promoter variants associated with bipolar disorder and schizofrenia. *Abstracts for the XIth World Congress of Psychiatric Genetics.*

*American Journal of Medical Genetics.* 2003 122B(1):1-190. Oral presentation.

**Stopkova P**, Vevera J, Paclt I, Zukov I, Lachman HM. *PI5K2A*: A candidate gene for 10p-linked psychiatric disorders. *American Psychiatric Association 156<sup>th</sup> Annual Meeting, New Research Abstracts, 2003 May*: p. 56. Oral presentation.

**Stopkova P**, Saito T, Papolos DF, Stryjer R, Strous RD, Lachman HM. Polymorphism screening of *PIP5K2A*: A candidate gene for 10p-linked psychiatric disorders. *Abstracts for the Xth World Congress of Psychiatric Genetics. American Journal of Medical Genetics.* 2002 114(7):697-890. Oral presentation.

**Stopková P**, Saito T, Papolos DF, Stryjer R, Strous RD, Lachman HM. Mutace genu *PIP5K2A* u pacientů s bipolární afektivní poruchou a schizofrenií. IV. sjezd Psychiatrické společnosti ČSL JEP, červen 2002. Poster.

### C. Další publikace in extenso s IF či bez něj:

Bares M, Brunovsky M, Kopecek M, **Stopkova P**, Novak T, Kozeny J, Hoschl C. Changes in QEEG prefrontal cordance as a predictor of response to antidepressants in patients with treatment resistant depressive disorder: A pilot study. *J Psychiatr Res.* 2007 Apr-Jun;41(3-4):319-25 **IF 3.301**

**Stopková P**. Léčba bipolární afektivní poruchy na začátku třetího tisíciletí. Bipolární afektivní porucha: jak zastavit kyvadlo? Bulletin Academia Medica Pragensis, 2006, roč. 3, č. 5, s. 15-18.

**Stopková P**. Farmakoterapie bipolární afektivní poruchy. *Referátový výběr z psychiatrie*, 2006, roč. 5, č. 1, s. 3-7.

Lachman, HM, **Stopkova P**, Pedrosa E, Margolis B, Aghalar MR, Saito T. Analysis of synapsin III -196 promoter mutation in schizofrenia and bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 2006;53:57-62. **IF 1.788**

Bareš, M., Brunovský, M., Kopeček, M., **Stopková P.**, Novák, T., Kožený, J., Čermák, J., Šoš, P., Höschl, C. EEG v predikci odpovědi na antidepresiva u pacientů s depresivní poruchou: přehled a rozšířená pilotní data. *Psychiatrie*, 2006, roč. 10, č. 4, s. 1-6.

Bareš, M., Brunovský, M., Kopeček, M., **Stopková P.**, Novák, T., Kožený, J., Vonásková, K., Čermák, J., Höschl, C. Změny prefrontální aktivity jako prediktor odpovědi na různá antidepresiva

u pacientů s rezistentní depresí. In *Nemocná duše - nemocný mozek: klinická zkušenost a fakta*. Praha: Galén, 2006, s. 1-3.

Komárek V, **Stopková P**, Suchopár J, Zahradníková L, Vendulka O, Kučera Z. Acidum valproicum/natrii valproas. *Remedia* 2006, 16: 14-26.

Lachman HM, **Stopkova P**, Aghalar-Rafael MA, Saito T: Association of schizophrenia in African Americans to polymorphism in synapsin III gene. *Psychiatr Genet*. 2005 Jun 15(2):127-32.

#### IF 2.366

Simová, M., Preiss, M., Bareš, M., Kopeček, M., Ježková, T., **Stopková, P.**, Klose, J. Změny osobnostních rysů v průběhu psychiatrické hospitalizace. Pilotní studie s Cloningerovým dotazníkem temperamentu a charakteru (TCI). *Psychiatrie*, 2004, roč. 8, č. 4, s. 286-292.

Stopka T, Zivny JH, **Stopkova P**, Prchal JF, Prchal JT. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3766-72.

#### D. Další vybrané abstrakty přednášek a posterů:

Novák, T., **Stopková, P.**, Fridrichová, H. Registr klinických dat pacientů s bipolární afektivní poruchou. *Psychiatrie*, 2006, roč. 10, č. Suppl. 3, s. 60-62.

Höschl, C., **Stopková, P.** Diskrétní a spojitě v konceptualizaci psychóz. In *Sborník přednášek sympozia Academia Medica Pragensis "Pokroky v péči o nezávažnější duševní onemocnění"*, III. ročník. neuveden: Academia Medica Pragensis - Amepra, 2006, s. 87-107.

**Stopková P**, Novák T, Růžičková M, Fridrichová H, Höschl C: Registr pacientů s bipolární afektivní poruchou. *Psychiatrie*, 2006, roč. 10, č. Suppl. 1, s. 69.

Bareš, M., Kopeček, M., **Stopková, P.**, Preiss, M., Vonásková, K., Seifertová, D., Höschl, C. Centrum pro léčbu rezistentní deprese Psychiatrického centra Praha: Od klinické praxe k výzkumu. *Psychiatrie*, 2006, roč. 10, č. Suppl. 1, s. 56.

Bareš, M., Brunovský, M., Kopeček, M., **Stopková, P.**, Novák, T., Vonásková, K., Kožený, J. Changes in prefrontal activity as a predictor of response to antidepressive medication in patients with

treatment resistant depressive disorder: a pilot study. *European Psychiatry*, 2006, vol. 21, no. Suppl. 1, p. S162.

Bareš M, Kopeček M, **Stopková P**, Preiss M, Vonásková K, Seifertová D, Höschl C: The Center for Treatment of Resistant Depression in Psychiatric Center Prague: from clinical practice to research. *Česko-Slovenská psychofarmakologická konference, 2006. Psychiatrie. Suppl. 1: 56*

Bareš M, Brunovský M, Kopeček M, **Stopková P**, Novák T, Kožený J, Vonásková K: Prefrontal activity changes as a predictor of response to antidepressive treatment in patients with resistant depression: A pilot study. *Česko-Slovenská psychofarmakologická konference, 2006. Psychiatrie. Suppl. 1: 57*

Kopeček M, Bareš M, Brunovský M, Novák T, **Stopková P**, Kožený J: EEG cordance as a predictor of antidepressive treatment – summary of 3 studies. *Česko-Slovenská psychofarmakologická konference, 2006. Psychiatrie. Suppl.1: 61*

## 10. Summary of PhD thesis

The PhD thesis is a summary of data from case-control studies of selected genes in patients with bipolar affective disorder, schizophrenia, and matched controls. Analysed genes are components of phosphoinositide metabolic pathway involved in neuronal signal transmission and regulation of synaptic function.

The first study is aimed at *phosphoinositide 4-phosphate 5-kinase type 2A (PIP5K2A)*. *PIP5K2A* takes part in phosphoinositide 4,5-bisphosphate synthesis. Polymorphism screening of *PIP5K2A* revealed the existence of an imperfect CT repeat polymorphism located near the exon 9-intron 9 splice donor site. A modest difference was found in the distribution of alleles from this highly polymorphic variant when bipolar and schizophrenic subjects were compared with controls; relatively rare short repeat variants were found more commonly in patients and homozygosity for a common long repeat variant was found more commonly in controls.

The second study concerns the promoter region of *PIP5K2A*. We identified a rare promoter variant -1007C→T. This mutation was found more frequently in patients with schizophrenia compared with controls and the only two homozygotes for this variant were patients with schizophrenia. There was no difference in the -1007C→T mutation in bipolar patients.

The third analysis is focused on *phosphatidylinositol 3-kinase type C3 (PIK3C3)*. The promoter region screening revealed a -432C→T substitution and a "C" insert at position -86. In each population analyzed, an increase in -432T was found in patients.

The next gene studied is *phosphoinositide 4-kinase (PIK4CA)* which catalyzes the first phosphorylation step in synthesis of phosphoinositide 4,5-bisphosphate, a critical phospholipid involved in signal transduction and vesicular trafficking in the brain and other organs. The preliminary screening of *PIK4CA* resulted in identification of 15 different polymorphisms. Several rare variants were found in three bipolar patients, three schizophrenia patients, and only one control. We identified also several common non-synonymous substitutions and one SNP in the putative promoter region. In bipolar patients, there was a moderate difference in the promoter SNP distribution with a trend to statistical significance.

In the last analysis we studied *synaptojanin 1 (SYNJI)*, an inositol 5-phosphatase, regulation synaptic vesicle recycling.

Previous mutation screening of *SYNJI* identified several rare variants found primarily or exclusively in patients with bipolar disorder. None of the rare variants were detected in an analysis of a new set of bipolar patients from the Czech republic created during 2001-2003 at the Psychiatric Clinic in Prague.

Both above described mutations, -432C→T in *PIK3C3* and -1007C→T in *PIP5K2A*, are remarkably similar to another promoter mutation described previously, -1898T→C in *SYNJI*. In each case, the promoter variants occur within or near an ATTT motif found in members of the POU family of transcription factors, such as Oct-1 and Brn-2. Members of the POU family of transcription factors are important regulators of gene expression during brain development and regulate neuronal postnatal function.

In addition, two of the variant alleles, *PIK3C3* -432T and *PIP5K2A* -1007T, both result in palindromes that are often found as core sequences for DNA binding proteins. Thus, the promoter variants we have identified may in fact bind several transcription factors in addition to members of POU family. This is supported by our EMSA experiments that show multiple band shifts for most of the promoter variants analyzed. The band shifts are indicative of an increased binding of protein extracted from human and mouse brains, as well as several other mouse organs, to alleles found more often in patients with bipolar disorder and schizophrenia.

In our analyses of several genes selected with consideration to their function and chromosomal location we identified several potentially functional mutations, which may contribute to bipolar and schizophrenia susceptibility. Abnormal regulation of phosphoinositide regulatory genes, possibly by members of the POU family of transcription factors, may be a pathway underlying the development of both bipolar disorder and schizophrenia. This hypothesis fits well with various aspects of pathogenesis of both disorders, including the therapeutic action of lithium, previous genetic linkage studies, recently identified candidate genes, and neurodevelopmental considerations.



## 12. Literatura – úplný seznam literatury je uveden v dizertační práci

- 1) Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002;7(4):405-11.
- 2) Barrett TB et al. (2003). Evidence for a single nucleotide polymorphism in the promoter of the G protein receptor kinase 3 gene is associated with bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 8(5):546-557.
- 3) Berrettini WH. 2000. Susceptibility loci for bipolar disorder: overlap with inherited vulnerability to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 245-251.
- 4) Berrettini WH et al. 1994. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5918-5921.
- 5) Berridge MJ, Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 341: 197-205.
- 6) Brzustowicz LM et al. 2000. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288: 678-682.
- 7) Casebolt TL, Jope RS. 1991. Effects of chronic lithium treatment on protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *Biol Psychiatry* 29(3):233-43.
- 8) Castellino AM, Chao MV (1999). Differential association of phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase with the EGF/ErbB family of receptors. *Cell Signal* 11(3):171-177.
- 9) Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. Genes for schizophrenia and bipolar disorder? Implications for psychiatric nosology. *Schizophr Bull*. 2006a Jan;32(1):9-16. Review.
- 10) Cremona O et al. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99: 179-188.
- 11) Cremona, O. et al. 2000. Assignment of SYNJ1 to human chromosome 21q22.2 and Synj12 to the murine homologous region on chromosome 16C3-4 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 88, 89-90.
- 12) Detera-Wadleigh SD et al. (1999). A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5604-5609.
- 13) Ekelund J et al. 2001. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet* 10(15): 1611-1617.
- 14) Ewald H et al. (2002). Search for a shared segment on chromosome 10q26 in patients with bipolar affective disorder or schizophrenia from the Faroe Islands. *Am J Med Genet* 114(2):196-204.
- 15) Faraone SV et al. 1998. Genome scan of European-American schizophrenia pedigrees: results of the NIMH Genetics Initiative and Millennium Consortium. *Am J Med Genet* 81: 290-295.
- 16) Foroud T et al. 2000. Suggestive evidence of a locus on chromosome 10p using the NIMH genetics initiative bipolar affective disorder pedigrees. *Am J Med Genet* 96: 18-23.
- 17) Gehrman T, Heilmeyer LMG. 1998. Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J Biochem* 253: 357-370.
- 18) Ginns EI et al. 1998. A genome-wide search for chromosomal loci linked to mental wellness in relatives at high risk for bipolar disorder among old order Amish. *Proc Natl Acad Sci* 95: 15531-15536.
- 19) Hallcher L, Sherman WR. 1980. The effects of lithium and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* 261: 8100-8130.
- 20) Hope BT et al. (1994). Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14:4318-4328.
- 21) Ilia M et al. (2002). Expression of Oct-6, a POU III domain transcription factor, in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159:1174-1182.
- 22) Jope RS et al. 1998. Selective increases in phosphoinositide signaling activity and G protein levels in postmortem brain from subjects with schizophrenia or alcohol dependence. *J Neurochem* 70: 763-771.
- 23) Jope RS, Bijur GN (2002). Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 beta and cell survival. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1:S35-45.
- 24) Katsel P, Davis KL, Haroutunian V. Variations in myelin and oligodendrocyte-related gene expression across multiple brain regions in schizophrenia: A gene ontology study. *Schizophr Res* 2005;79:157-173
- 25) Ketterling RP et al. 1999. Reported in vivo splice-site mutations in the factor IX gene: severity of splicing defects and a hypothesis for predicting deleterious splice donor mutations. *Hum Mutat* 13: 221-231.
- 26) Lachman HM et al. 1997. Linkage studies support a possible locus for bipolar disorder near the velo-cardio-facial syndrome region on chromosome. *Am J Med Genet* 74: 121-128.
- 27) Latchman DS (1999). POU family transcription factors in the nervous system. *J Cellular Physiology* 179:126-133.
- 28) Lenox RH, Wang L (2003). Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. *Mol Psychiatry* 8(2):135-44.
- 29) Levinson DF et al. 1998. Genome scan of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 155: 741-750.

- 30) Levinson DF et al. 2000. Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: Schizophrenia linkage collaborative group III. *Am J Hum Genet* 67(3): 652-663.
- 31) Lou H et al. 1999. Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Bio* 19: 78-85.
- 32) Maziade M et al. (2001). A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a linkage study in 13 target chromosomes. *Molecular Psychiatry* 6(6):684-93.
- 33) McPherson PS et al.. 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379: 353-357.
- 34) Merlot S, Firtel RA (2003). Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* 116:3471-3478.
- 35) Mowry BJ et al. 2000. Second stage of a genome scan of schizophrenia: Study of five positive regions in an expanded sample. *Am J Med Genet (Neuropsych Genet)* 96: 864-869.
- 36) Naga Prasad SV et al. (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta 2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta arrestin complex. *J Cell Biol* 158 (3):563-575.
- 37) Nurnberger JI, Foroud T 1999. Chromosome 6 workshop report. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 88:233-238.
- 38) O'Donnell T et al. 2003 Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myoinositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 13(3):199-207.
- 39) Orita M et al. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770.
- 40) Papolos DF et al. 1996. Bipolar spectrum disorders in patients diagnosed with velo-cario-facial syndrome: Does a hemizygous deletion of chromosome 22q11 result in bipolar affective disorder. *Am J Psychiatry* 153(12): 1541-1547.
- 41) Perez-Juste G, Garcia-Silva S, Aranda A. 2000. An element in the region responsible for premature termination of transcription mediates repression of c-myc gene expression by thyroid hormone in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 275(2): 1307-1314.
- 42) Pulver AE et al. 1994. Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: Part 1. *Am J Med Genet* 54: 36-43.
- 43) Rice JP et al. 1997. Initial genome scan of the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 1, 6, 8, 10, and 12. *Am J Med Genet (Neuropsych Genet)* 74: 247-253.
- 44) Reynolds AJ et al. 1999. Evidence for phosphatidylinositol 4-kinase and actin involving in the regulator of 1211 be to active growth factor retrograde transport. *J Neuro Chem* 73: 87-95.
- 45) Saito T et al. (2001). Mutation analysis of SYNJ1: a possible candidate gene for chromosome 21q22-linked bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 6(4): 387-95.
- 46) Schwab SG et al. 2001. Association of SNPs with schizophrenia on chromosome 10p, a region with previously detected linkage. *Am J Med Genet* 105(7): 562 (abstract).
- 47) Shaw SH et al. 1998. A genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Am J Med Genet (Neuropsych Genet)* 81: 364-376.
- 48) Shyng SL et al. 2000. Modulation of nucleotide sensitivity of ATP-sensitive potassium channels by phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase. *Proc Natl Acad Sci* 97(2): 937-941.
- 49) Spitzer RL, Endicott J, Robins E (1978). Research diagnostic criteria: Rationale and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 35:773-782
- 50) Stefansson H et al. (2003). Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in Scottish population *Am J Hum Genet.*72(1):83-7.
- 51) Straub RE et al. 1994. A possible vulnerability locus for BP affective disorder on chromosome 21. *Nat Genet* 8: 291-296.
- 52) Straub RE et al. 1998. A schizophrenia locus may be located in region 10p15.1. *Am J Med Genet* 81: 296-301.
- 53) Tkachev D et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet.* 2003;362(9386):798-805.
- 54) Toker A, Cantley LC (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676.
- 55) Tsuang DW et al. 2001. Examination of genetic linkage of chromosome 15 to schizophrenia in a large veterans affairs cooperative study sample. *Am J Med Genet (Neuropsych Genet)* 105: 662-668.
- 56) Yoshikawa T et al. 2001. Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Mol Psychiatry* 6: 202-210.